

Resumen

La fabricación de nuevos andamios biodegradables capaces de guiar y estimular la regeneración ósea es un objetivo de gran importancia en la ingeniería de los tejidos. En este sentido, se han desarrollado innovadoras técnicas de conformación como el rapid prototyping para fabricar andamios con geometría y porosidad controlada adaptable según las propiedades del tejido a regenerar.

El objetivo de este proyecto es de estudiar el comportamiento celular en andamios poliméricos de ácido poliláctico/polietilenglicol (PLA/PEG en las proporciones 95/5) y compuestos de PLA/PEG con adición de 50% en peso de vidrio de fosfato de calcio (G5) fabricados mediante la técnica de "rapid prototyping".

El proyecto se puede dividir en dos partes principalmente. Primero se fabricaron los andamios usando la técnica de rapid prototyping, permitiendo así la obtención de complejas estructuras 3D de manera repetitiva y precisa. Y en una segunda parte se estudió la respuesta celular a los andamios desarrollados. Para esto se usaron células mesenquimales de rata y se evaluó la adhesión y proliferación celular, así como la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica.

Se ha demostrado gracias a las imágenes de inmunofluorescencia que la adhesión de las células en los andamios era favorecida por la adición de vidrio G5 tal como la homogeneidad de la distribución de estas en toda la estructura. Se muestra además que las células tenían a expandirse en los andamios de PLA/G5, mientras se quedan contraídas en la mezcla polimérica, sugiriendo una afinidad de estas por el vidrio.

Los dos materiales permiten la proliferación celular según el ensayo realizado con Alamar Blue, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos materiales, y pareciera que las ventajas del vidrio de fosfato de calcio sean más visibles durante los primeros días de cultivo. No obstante, se vieron más células en el material compuesto hasta los 3 días corroborando las observaciones hechas gracias a la microscopia de fluorescencia.

Finalmente, el ensayo de diferenciación mediante la determinación de fosfatasa alcalina comprobó la especialización de las células en osteoblastos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas con la adición del vidrio G5.





Índice

Resumen	1
1. Introducción	5
1.1. Ingeniería de tejidos	5
1.2. El andamio para la ingeniería tisular : estado del arte.....	6
1) Disolución y colada con liberación de partículas	7
2) Gas foaming	8
3) Separación de fases (Thermal induced phase separation)	8
4) Rapid Prototyping	10
1.3. Generalidades sobre los biomateriales	15
1) Biocompatibilidad.....	16
2) Biodegradabilidad.....	17
1.4. Objetivo del proyecto	18
2. Teoría	19
2.1. Generalidades sobre el hueso y su regeneración	19
1) Tipos de huesos y funciones.....	19
2) Composición del hueso	23
3) Remodelación ósea.....	24
4) Consolidación de fracturas y defectos óseos	25
2.2. Células mesenquimales y su diferenciación.....	26
2.3. Materiales utilizados para la fabricación de andamios para regeneración ósea.....	27
1) Ácido Poliláctico	27
2) Polietilenglicol.....	30
3) Vidrio G5	32
2.4. El Rapid Prototyping (nozzle-based printing).....	33
3. Materiales y métodos.....	35
3.1. Fabricación de las muestras.....	35
1) Preparación de la solución polimérica	35
2) Fabricación de los andamios por rapid prototyping	35
3) Caracterización de los andamios.....	38
4) Preparación de los andamios para los ensayos.....	42
3.2. El cultivo celular.....	42
1) La descongelación	42
2) El cambio de medio.....	43
3) La Tripsinización o pase de las células	45
4) El contaje celular.....	45
5) Preparación de los andamios y siembra.....	46
3.3. Los ensayos de biocompatibilidad	47
1) Ensayo de adhesión : Inmunofluorescencia	47
2) Ensayo de proliferación : AlamarBlue.....	49
3) Ensayos de diferenciación : Fosfatasa Alcalina y Osteocalcina.....	50
4. Resultados y discusiones	55
4.1. Inmunofluorescencia	55
1) 3 días de cultivo.....	55
2) 14 días de cultivo	58
4.2. Proliferación celular (ensayo Alamar Blue).....	60
4.3. Fosfatasa Alcalina	62
1) Medida de ALP con medio normal.....	62
2) Medida de ALP con medio osteogénico.....	63
Debido al bajo número de muestras usado, se propone repetir el experimento para n=5 en estudios	



futuros.	65
4.4. Osteocalcina.....	65
5. Conclusiones	67
6. Costes e impacto ambiental del proyecto	68
6.1. Costes del proyecto	68
1) Materiales y reactivos	68
2) Personal.....	68
6.2. Impacto ambiental	69
7. Referencias.....	71



1. Introducción

1.1. Ingeniería de tejidos

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario que aplica los principios de ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de substitutos biológicos que regeneran, mantienen, o mejoran la función del tejido [1]. Para ello se necesita la combinación adecuada de tres factores : células, señales y andamios . Entender los factores y señales que favorecen el crecimiento celular es imprescindible para llegar hasta la formación de tejidos nuevos listos para la implantación.

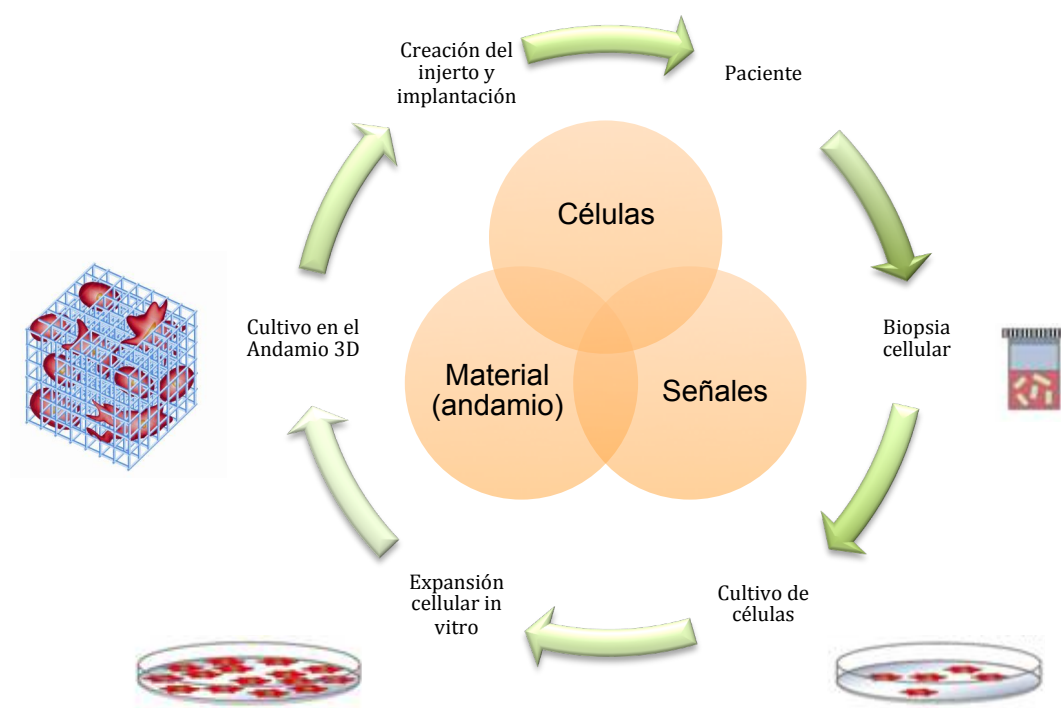


Figura 1.1 : Etapas y componentes de la ingeniería de los tejidos.

Esta terapia es bastante diferente de los tratamientos estándares tal como el reemplazo definitivo del tejido defectuoso por una prótesis o el trasplante que implican muchas cuestiones clínicas. De hecho ya que se utilizan las células del paciente, no será cuestión de rechazo y tampoco se necesitaran medicinas inmunosupresoras. Además, el paciente sufre solo una operación para colocar el injerto, luego tal biomaterial se degradará poco a poco [2].

Una de las principales dificultades en la creación de un tejido nuevo es que las células

tienen que expandirse in vitro donde no se cumplen las mismas condiciones : en el cuerpo, señales químicas, mecánicas y eléctricas del medio exterior a las células van a estimularlas para que se unan hasta formar el órgano. De hecho, solas, siempre van a crecer en dos dimensiones, nunca darán un órgano tridimensional. El desafío consiste entonces en reproducir lo más posible esas condiciones naturales [3].

Por eso, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para paliar este problema : biorreactores para regular el flujo nutritivo, la compresión o tensión de células, la utilización de factores de crecimiento... Así para crear un tejido, se necesitan muchas disciplinas como ciencia de los materiales, biología molecular y celular, ingeniería química, mecánica bioquímica, medicina, cirugía... y aunque la perfección todavía no se ha conseguido, se puede fácilmente imaginar en un futuro cerca la creación de una maquina capaz de sintetizar cualquier tejido o órgano resolviendo los problemas ligados al transplante [2].

1.2. El andamio para la ingeniería tisular : estado del arte

La principal función del andamio como hemos dicho es de imitar la matriz extracelular natural de manera temporal. Mientras el hueso nuevo esta creciendo, el andamio tiene que degradarse para permitir el crecimiento celular a través de una combinación de señales estructurales y químicas. Tiene entonces que ser elaborado de un biomaterial (no citotóxico) cuya cinética de degradación se pueda controlar [4].

Tiene que proveer soporte mecánico al nuevo tejido que esta creciendo. Por lo tanto sus características mecánicas tienen que ajustarse a las del hueso, lo que implica una buena elección del material y una estructura en 3D adecuada.

Sirve también de sustituto biológico de adhesión y tiene que permitir la migración celular. El control de la porosidad y de la interconectividad entre los poros es imprescindible para el crecimiento celular y la vascularización.

Y finalmente guiar el desarrollo del nuevo tejido con las funciones adecuadas. Se necesita una superficie biocompatible y el control de señales biológicas, tras la difusión de algunos iones por ejemplo, para promover la adhesión, proliferación y diferenciación de las células en el andamio [5].



Los andamios pueden ser producidos tras varias técnicas tal como la disolución y colada con liberación de partículas, el gas foaming, phase separation, emulsion freeze drying y el rapid prototyping o prototipado rápido, que es la técnica usada en este proyecto.

Cada proceso tiene sus ventajas y limitaciones en cuanto al control del tamaño de los poros, de su geometría, interconectividad y distribución.

1) Disolución y colada con liberación de partículas

La disolución y colada con liberación de partículas, permite producir andamios con alto nivel de porosidad [6]. Se disuelve un polímero en un solvente orgánico y se añade partículas, principalmente sales tal como el citrato sódico o cloruro de sodio, con dimensiones específicas a la solución antes de conformarla. A continuación, cuando se evapora el solvente se genera una estructura de material compuesto antes de que se coloque en un baño para disolver las partículas. Se obtiene entonces un andamio en 3D con un alto nivel de porosidad directamente dependiente del tamaño y del porcentaje de sales en el material [7].

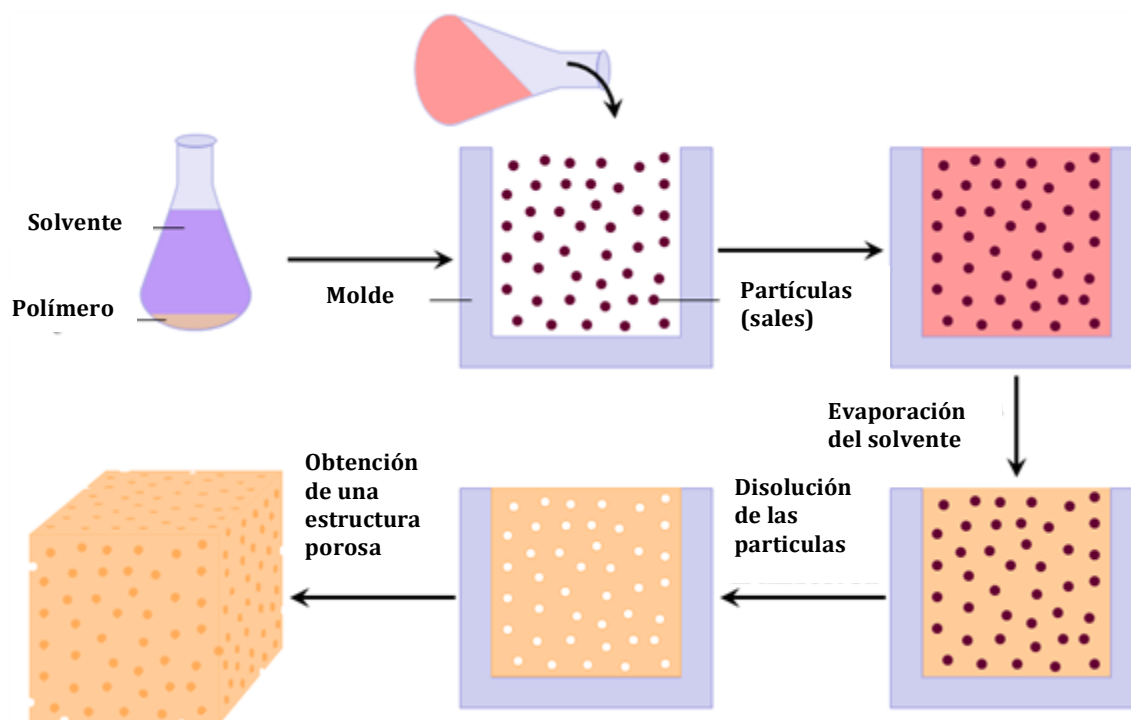


Figura 1.2 : Descripción del método de disolución y colada [67]

Las espumas producidas con disolución y colada pueden llegar hasta 95% de porosidad y un tamaño medio de poro de 150 μm [8].

Es una técnica sencilla, funciona con varios biomateriales y no necesita equipamiento muy específico ; pero el uso de solvente orgánico (puede comprometer la biocompatibilidad) y el

poco control del tamaño de los poros tal como la interconectividad son problemas que han intentado resolverse en las otras técnicas [9].

Navarro et al, han desarrollado andamios compuestos con ácido poli(95L/5DL)láctico (PLA) y fosfato cálcico con esta técnica obteniendo una porosidad de 97%, un módulo de Young de 74,5 hasta 120 MPa y una resistencia en compresión de 17,5 hasta 20,1 MPa con el PLA y el PLA/fosfato cálcico respectivamente [10].

2) Gas foaming

Permite producir andamios de polímero biodegradable usando una gran presión de dióxido de carbono. [11] [12] Se exponen durante varias horas unos discos de polímero a grandes presiones de CO₂ a temperatura ambiente para saturarlos. A continuación, se reduce rápidamente la presión a presión atmosférica reduciendo por lo mismo la solubilidad del gas en el polímero. Tiene como consecuencia la creación de una inestabilidad termodinámica del CO₂ disuelto en los discos y por lo tanto la nucleación y el crecimiento de unas burbujas de gas en el polímero [13].

Con esta técnica, se obtienen esponjas de polímero con una porosidad de aproximadamente 93% y un tamaño de poro medio de 100 µm. Es bastante parecida al disolución y colada pero tiene la ventaja de no necesitar ningún solvente orgánico. Sin embargo, su estructura esponjosa le procure propiedades mecánicas bastante débiles.

3) Separación de fases (Thermal induced phase separation)

Esta técnica permite producir andamios micro-porosos (5-600 µm) eficaces para la ingeniería tisular ósea [14]. Primero, se disuelve un polímero en un solvente a alta temperatura antes de que se haga la separación de fase. Esta se hace por descomposición espinodal producida por enfriamiento o temple de la solución [9] [15].



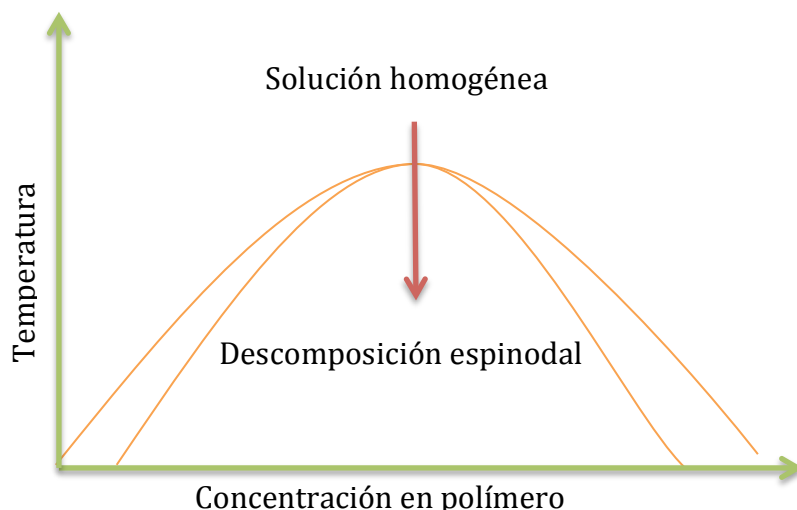


Figura 1.3 : Descripción de la descomposición espinodal.

Durante el enfriamiento, se diferencian una fase rica en polímero (puede ser líquida o cristalina) y una fase orgánica con el solvente. Cuando la viscosidad de la primera es suficientemente alta, durante la cristalización o la transición vítrea por ejemplo, la reacción se para y se puede por lo tanto quitar el solvente sublimándolo. La sublimación haciendo el vacío y bajo temperatura de sublimación del solvente : en el caso del dioxano, podría ser expuesto a unos 60° durante 48 horas para quitarlo [14].

El andamio obtenido presenta una porosidad de 90% y un control del tamaño de poros (100-150 μm para la ingeniería tisular ósea por ejemplo) puede producir macro poros regulares y bien interconectados en el caso de una descomposición espinodal completa. Otra vez se puede usar con un largo panel de biomateriales y el uso de solvente orgánico limita su utilización por razón de biocompatibilidad.

Emulsion freeze drying

Este método es una aplicación particular del proceso de separación de fases y consiste en la formación de una emulsión por homogeneización de una solución de polímero y solvente con agua. Se enfría rápidamente la emulsión para guardarla con su estructura en estado líquido. Luego se quita el solvente y el agua por freeze-drying o liofilización, imponiendo baja presión y temperatura para llegar hasta la sublimación del agua [16].



Figura 1.4 : Descripción del proceso de Emulsion freeze drying [68]

Se obtienen esponjas con una porosidad de 91-95% con un tamaño de poro de 13 hasta 35 μm (se han encontrado también poros de mas de 200 μm) con una gran interconexión entre si.

Es un método simple y no requiere materiales muy complejos, pero los andamios obtenidos sufren malas propiedades mecánicas [17].

4) Rapid Prototyping

El problema de las precedentes técnicas es la imposibilidad de controlar la microestructura del andamio con precisión y repetitividad en cuanto al tamaño, la distribución y interconectividad de los poros [18].

Por eso, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de diseño de andamio asistidas por ordenador permitiendo por lo tanto la concepción de estructuras en 3D muy complejas con una gran reproducibilidad [19].

El rapid prototyping también conocido como Solid Freeform Fabrication es un grupo de técnicas que permiten la creación de objetos en tres dimensiones tras la deposición y el diseño de capas de material usando maquinas controladas por ordenador. Es fundado en una técnica llamada diseño asistido por ordenador (DAO) : datos en dos dimensiones representando secciones del objeto son obtenidos gracias a un modelo creado por ordenador.

[20] La principal ventaja es que se puede elegir totalmente la estructura a construir con formas personalizadas obteniendo un mejor control en la morfología de los poros, y ajustar la composición del material en función de las células utilizadas y de la estructura [4].

3D Printing

La tecnología de impresión 3D fue desarrollada en el Massachusetts Institute of Technology (MIT) para generar aparatos capaces de liberar medicinas en el cuerpo y luego, cuando se han mejorado los procesamiento de diseño tridimensionales, andamios para la ingeniería tisular [21] [22].

Es un proceso de fabricación 3D por capas en el cual un modelo de la sección en dos dimensiones creado por ordenador es impresa en una capa de polvo por deposición. Tras la impresora, un chorro de pegamento adhiere a la primera capa de material que ha sido depositada. Perfiles en 2D son sucesivamente impresos en nuevas capas de polvo y las partículas son selectivamente ligadas entre si. Por lo tanto, las capas en dos dimensiones se ligan una encima de la otra para formar un objeto sólido en 3 dimensiones. Luego, se quita el exceso de polvo que no habrá adherido. La resolución lograda es de unos 300µm de anchura.

Kim et al. combinaron el 3D printing con la técnica de disolución de partículas para crear andamios porosos de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) mezclado con partículas de sal y un solvente orgánico adecuado. El andamio obtenido presentaba poros de 45-150µm con una porosidad de 60% [23].

Luego, Lam et al. formularon una mezcla de polvos poliméricos basados en el almidón capaces de ligarse entre si usando agua para conseguir una mejor biocompatibilidad. Intentaron también mejorar las propiedades mecánicas de los andamios producidos infiltrando en la estructura una solución de copolímero de ácido poli-L-láctico y policaprolactona [20].

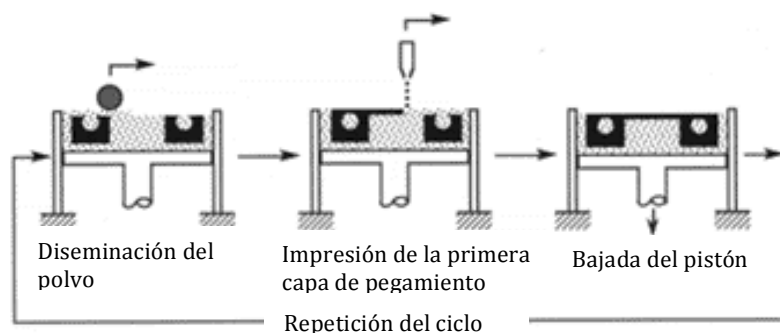


Figura 1.5 : Descripción del proceso de 3D Printing [69]

Esta técnica permite la realización de estructuras complejas con una excelente resolución pero necesita material muy costoso y un tiempo largo para conseguir un andamio con una anchura adecuada ya que se hace capa por capa [24].

Esterolitografía

Es una técnica de fotopolimerización donde luz UV es aplicada para irradiar la superficie de una resina líquida de fotopolímero y solidificarla.

Un laser UV traza la sección en dos dimensiones del modelo en la resina de monómero polimerizándola y haciéndola solidificar mientras lo demás queda líquido. Debido a la absorción y dispersión del rayo UV, la reacción ocurre sólo en la superficie del líquido [25].

La máquina usada es compuesta de una plataforma sumergida en una cuba de resina y un laser UV iónico de helio-cadmio o argón.

Una vez la primera capa es impresa en la superficie de la resina por el laser, el elevador baja para sumergirla y cubrirla de monómero. Luego el elevador sube y una hoja quita el monómero excedente dejando la cantidad necesaria a la impresión de la siguiente capa. El laser puede entonces empezar de nuevo a imprimir siguiendo el modelo que ha sido creado por Diseño Asistido por Ordenador encima de la primera capa solidificada.

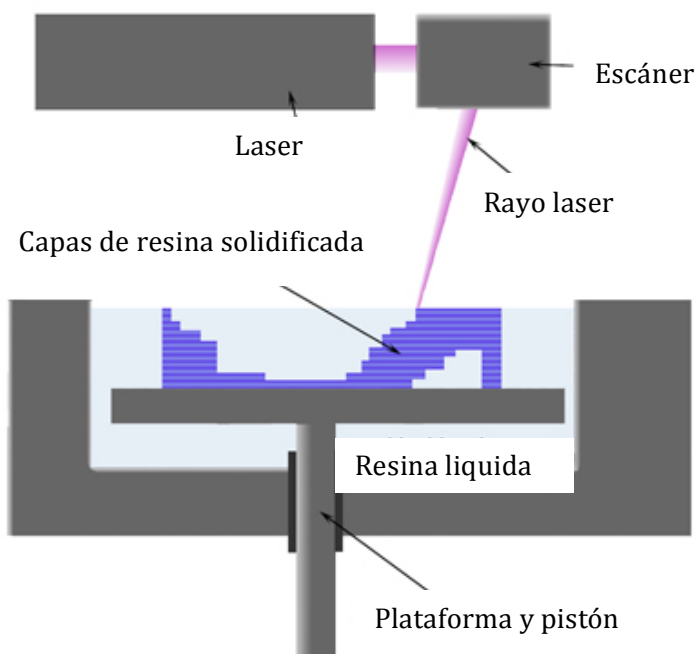


Figura 1.6 : Descripción del método de Esterolitografía [70]

Chu et al. produjeron implantes porosos de ácido hialurónico usando moldes de epoxi. Una suspensión de ácido hialurónico y acrilato tratable térmicamente fue conformada en el molde para obtener andamios con canales interconectados. La resolución de los canales era de 366 μm [26].

Dos arquitecturas diferentes han sido estudiadas por Chu et al. , canales ortogonales y radiales. Los resultados preliminares muestran que era posible controlar la geometría del tejido óseo regenerado tras la arquitectura interna de los andamios [27].

Sodian et al. fabricaron también andamios con una porosidad de 90%, poros de 20-1000 μm y una gran interconectividad con esta técnica. La mayor desventaja de esta técnica es otra vez el gran coste de la máquina y el hecho de que se puede usar sólo con polímero compatibles con los UV [28].

Selective laser sintering

El selective laser sintering usa un rayo laser de CO_2 (25-50 W) para calentar el material en llegando hasta su temperatura de transición vítrea. La tensión superficial de los granos es superada y fusionan entonces entre si. Antes de que el polvo sea sinterizado, todo el polvo es calentado poco debajo de esta temperatura para facilitar el proceso [29].

Cuando la primera capa ha sido sinterizada por el rayo, el baño de polvo baja y la cuba de alimentación en polvo sube para depositar una nueva capa y un rodillo extiéndola.

Capa por capa, el polvo sinterizado por el laser forma la estructura diseñada por ordenador mientras lo demás queda en el soporte hasta que se quite al finalizar el proceso. A continuación, se puede utilizar el polvo excedente para crear otros andamios [30].

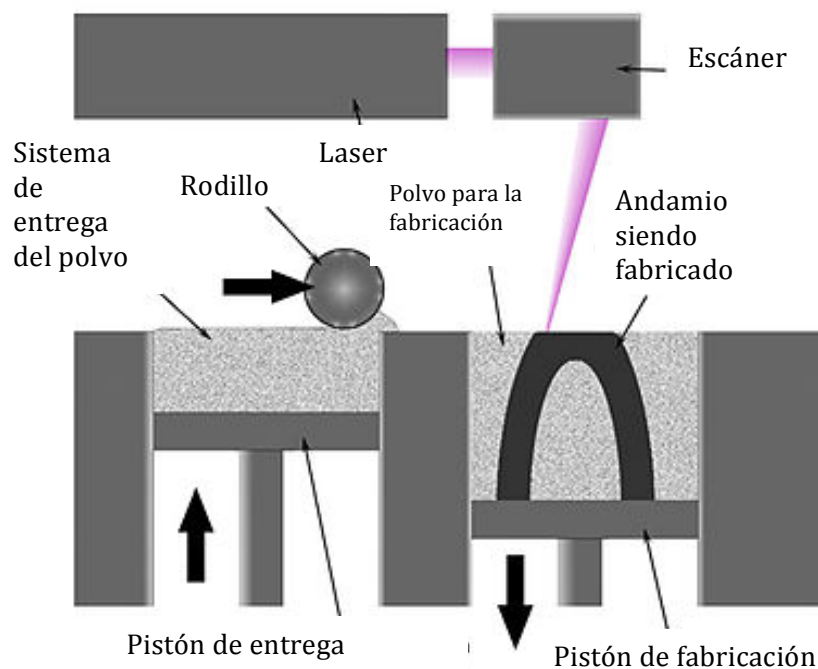


Figura 1.7 : Descripción del proceso de Selective Laser Sintering [71]

Vail et al. demostraron que era la técnica de predilección para la fabricación de andamios cerámicos complejos para la ingeniería tisular ósea [31].

De hecho, Tan et al. sinterizaron por Selective Laser Sintering una mezcla de PEEK y hidroxiapatita con diferentes porcentajes en peso de mezcla y variando la potencia del láser y la temperatura. Obtuvieron una porosidad de 40% con un tamaño de poro de 30-2500 μ m [32]

Pero se puede también hacer andamios de polímero como lo hicieron Williamsa et al. Con esta técnica, crearon andamios de policaprolactona con poros de 1,75 hasta 2,5 mm con una porosidad total de 63-70% para la ingeniería tisular ósea y de cartilago [33].

Esta técnica permite un gran control del tamaño de poro y de su interconectividad pero tiene su límite en la resolución de los microporos. Además, se puede usar con cualquier biomaterial que pueda pulverizarse tal como la mayoría de las biocerámicas y polímeros.

Finalmente, como en todas las técnicas de Rapid Prototyping, el precio del equipamiento es una desventaja significativa.

Fused Deposition Modeling

En esta técnica, un polímero o un metal es mezclado y puesto en una cuba calentadora antes de ser extrudido a través de una boquilla. Tras el control de la boquilla, se puede

controlar la temperatura para conseguir la fundición del material y una viscosidad y flujo adecuados. El material fundido es impreso siguiendo el modelo de diseño creado por ordenador. Una vez la primera capa es extruída, solidifica inmediatamente para servir de soporte a la siguiente quedando a una temperatura poco debajo de la de fundición para asegurar una buena adhesión entre las diferentes capas.

Ha sido demostrado que se podía obtener una porosidad de 80% con poros de 100-2000µm [34][35][36]. Tellis et al. produjeron andamios de polibutileno tereftálico obteniendo una porosidad de 65% con poros de 100 hasta 1000µm para la regeneración del hueso trabecular [37].

Zein et al. desarrollaron andamios de policaprolactona con una estructura en panal con canales de 160-770 µm.

Samar et al. usaron un material compuesto de fosfato tricálcico y polipropileno para conseguir poros de 160 µm y una resistencia a la tracción de 12,7 MPa mientras la del hueso trabecular es de 7,4 MPa.[38]

El control del tamaño de poro y una total interconectividad puede obtenerse mediante esta técnica pero se limita a los polímeros termoplásticos ya que se necesita fundirlo. Por otra parte, su gran desventaja es la dificultad en la calibración de la maquina en caso de cambio de material. Vozzi et al. desarrollaron andamios de policaprolactona y ácido poli-L-láctico de 20 µm de anchura [39].

1.3. Generalidades sobre los biomateriales

Los biomateriales son definidos como “materiales ideados para interaccionar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo” según la Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials, U.K, 1992. O también “una sustancia sistemáticamente y farmacológicamente inerte diseñada para implantación dentro de un sistema vivo o su incorporación en este”, según Williams D. Definitions in Biomaterials, Amsterdam : Elsevier, 1987. Esos materiales tienen que ser capaces de ser puestos en contacto con los tejidos o flujos humanos sin dar lugar a efectos negativos o reacciones durante largas estancias.

Se pueden clasificar según su composición (polímero, metal, cerámica, material compuesto), su origen (sintético o natural), y finalmente según su interacción con el cuerpo :

Primera generación : materiales casi-inertes.

La finalidad de estos materiales es de conseguir una combinación adecuada de propiedades físicas iguales a las del tejido reemplazado con la mínima respuesta tóxica. Es el caso de las prótesis articulares por ejemplo

Segunda generación : materiales bioactivos o absorbibles

Los bioactivos producen una acción y reacción controladas en el entorno fisiológico. Crean un enlace con los tejidos que les rodean mediante la activación de una respuesta biológica específica en la interfase. Es el caso de algunas cerámicas, vidrios activos, o materiales compuestos.

Los absorbibles presentan una degradación química y absorción controlada que es reemplazado por el tejido huésped. Es una particularidad de muchos polímeros degradables.

Tercera generación : estimulador de respuesta celular

Estos materiales estimulan respuestas celulares específicas al nivel molecular. Presentan características bioactivas y reabsorbibles y da lugar a la medicina regenerativa [40].

1) Biocompatibilidad

A continuación, se puede proponer una definición de un material biocompatible. La biocompatibilidad es la capacidad de un material para llevar a cabo sus prestaciones con una respuesta apropiada del huésped en una situación específica, es decir sin producir efecto sistémico o local no deseado. Depende de múltiples variables físicas y químicas del material. De hecho el material influye sobre la biocompatibilidad por sus propiedades de volumen, sus propiedades superficiales (rugosidad, carga superficial, hidrofiliicidad), y el diseño y el proceso de manufactura (dimensiones, selección de materiales, esterilización).

La biocompatibilidad engloba conceptos que son la bioseguridad y la biofuncionalidad.

-De forma general, la bioseguridad es la exclusión de efectos nocivos del biomaterial sobre el organismo.

-La biofuncionalidad es un aspecto más específico y traduce la necesidad del material



de ser capaz de desencadenar una respuesta benéfica del organismo receptor para el funcionamiento óptimo del dispositivo médico.

Finalmente, la biocompatibilidad puede ser determinada experimentalmente *in vitro*, los parámetros a cuantificar son la citotoxicidad, la adhesión, la proliferación y la diferenciación entre otros ; o *in vivo*, en estudios en animales (debe tener en cuenta las diferencias biomecánicas y el diseño de experimentos).

Se puede proponer una lista no exhaustiva de los principales biomateriales clasificado por familia de material. [41]

Biomateriales

- Polímeros
 - Polímeros sintéticos
 - Poliuretano
 - PTFE
 - Polietileno
 - Polipropileno
 - Poliacrilatos
 - PMMA
 - Phema
 - Silicona
 - Biopolímeros
 - PLLA
 - Colágenos
 - Elastina
 - Mucopolisacáridos
 - Celulosa
 - Proteoglicanos
 - Quitina
- Metales
 - Acero inoxidable
 - Aleaciones de Cobalto-Cromo
 - Titanio
- Cerámicas
 - Carbono
 - Alumina
 - Zircona
 - Cerámicas resorbibles (incluye los fosfatos de calcio)
- Compuestos (polímeros/fase inorgánica)
 - Reforzado por fibras
 - Reforzado por partículas

2) Biodegradabilidad

Un material biodegradable es un material capaz de sufrir descomposición en contacto con el dióxido de carbono, el metano, el agua, componentes inorgánicos y biomasa (norma ASTM D-5488-94d y Europea EN 13432). La biodegradación de un material se hace según la acción enzimática de microorganismos y medir o ensayar la biodegradabilidad de un



material es por lo tanto bastante complejo. Los ensayos se hacen bajo medios diferentes que sea líquido y inerte, y los productos resultando son analizados. La hidrofobicidad, el peso molecular, o la cristalinidad hacen parte de las características que se pueden explorar para medir la evolución de la biodegradabilidad de un material [42].

1.4. Objetivo del proyecto

El objetivo general de este proyecto es el desarrollo de estructuras 3D biodegradables que actúen como andamios temporales para aplicaciones en ingeniería de tejidos, específicamente para regeneración ósea. Dichos andamios fabricados mediante la técnica de rapid prototyping o "prototipado rápido" a partir de ácido poliláctico (PLA) y la combinación del PLA y partículas de vidrio soluble de fosfato de calcio han sido previamente desarrollados y caracterizados desde el punto de vista físico-químico en el grupo de "Biomateriales para Terapias Regenerativas" del IBEC.

El objetivo final del presente proyecto es completar la caracterización de dichos andamios desde el punto de vista biológico estudiando la respuesta celular in vitro utilizando células mesenquimales de rata.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

1. Fabricación de andamios 3D de PLA y PLA/vidrio de fosfato de calcio
2. Optimización y evaluación de la proliferación celular mediante Alamar Blue
3. Análisis de la adhesión y colonización de los andamios por parte de las células utilizando la técnica de inmunofluorescencia.
4. Evaluación de la expresión de marcadores osteogénicos tales como fosfatasa alcalina y osteocalcina con y sin el uso de medio osteogénico.



2. Teoría

2.1. Generalidades sobre el hueso y su regeneración

En esta parte se estudiará el hueso en cuanto a su población de células y su modo de regeneración. Así se podrá entender en qué caso y por qué se necesitan la ingeniería tisular y los andamios que se fabrican en este proyecto.

1) Tipos de huesos y funciones

El hueso es definido como un tejido conjuntivo, es decir un conjunto de células que cooperan para llevar a cabo unas funciones biológicas y mecánicas en el organismo.[40]

De hecho, el hueso asegura tanto sostén y movilidad como la regulación del metabolismo ya que es el principal depósito de algunos iones.

Su particularidad reside en su composición : contiene una gran parte de material inorgánico (sales minerales) estrechamente ligada a la matriz orgánica. Las sales minerales, a menudo bajo forma de cristales de hidroxiapatita, proveen rigidez mientras la flexibilidad es dada por la fase orgánica.

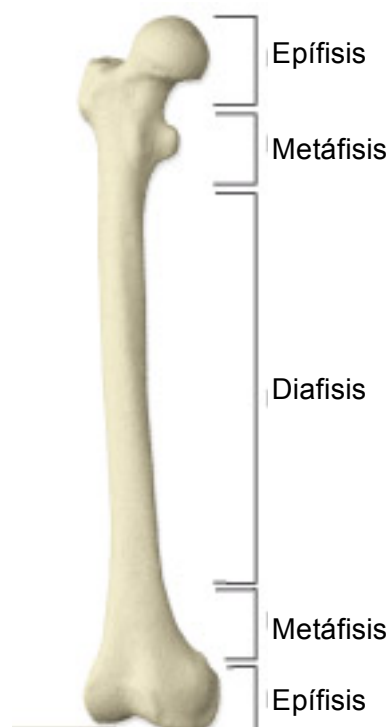


Figura 2.1 : El fémur [72]

Se diferencian tres tipos de huesos según su forma : largos, cortos o planos.

Los largos son huesos oblongos (una dimensión predomina las otras) y se pueden dividir en 3 partes, el epífisis, la metáfisis y la diáfisis :

La diáfisis corresponde a la parte central del hueso, la epífisis son las dos extremidades y la metáfisis, también llamada cartílago de crecimiento ya que solo se osifica al final del crecimiento, hace la unión entre los dos primeros.

Este tipo de huesos se encuentran principalmente en los brazos, las piernas y los dedos.

P.E. : El tibia, el fémur, las falanges.



Figura 2.2 : La rótula [72]

Los huesos cortos pueden ser redondos, piramidales, cúbicos, o irregulares pero siempre tienen sus tres dimensiones del mismo tamaño. Es el caso de la rótula y de los huesos de la muñeca.



Figura 2.3 : El hueso parietal [72]

Finalmente los huesos planos, tal como el hueso parietal o la escápula, tienen dos de sus dimensiones mucho más superiores a su espesor.

A parte de eso, se puede también distinguir en el hueso mismo, dos tipos de tejidos óseos : El hueso trabecular y el hueso cortical.

El hueso trabecular o esponjoso, llamado así debido a su gran porosidad (50-90%), se encuentra sobre todo en las epífisis de los huesos largos, en la parte interior de los huesos largos y planos. Es formado por una red de finas placas de tejidos, las trabéculas, formando por lo tanto unas porosidades interconectadas rellena de médula ósea roja productora de células sanguíneas y recorrida por vasos sanguíneos. La estructura final depende mucho en las sollicitaciones que sufre el hueso ya que las trabéculas se alinean según las líneas de tensión provocadas por la bipedestación. Pero su función resulta más en una acción metabólica (gracias a la médula roja) que en la mecánica de soporte o protección [43].

El hueso cortical o compacto se encuentra en la capa exterior del hueso y en particular en la diáfisis. Tiene una estructura densa (con una porosidad aproximada de 10%) como la del marfil debida no a la presencia de trabéculas sino de sistemas Haversianos. Son laminillas óseas calcificadas cilíndricas (también denominada osteona) orientadas según el eje

longitudinal del hueso. Entre ellas están los osteocitos, las principales células óseas. Cada osteona rodea a un grupo de vasos sanguíneos albergados en un conducto central, el conducto de Havers. Estos conductos están ligados entre sí, con la cavidad medular del hueso trabecular y la superficie del hueso gracias a otros canales horizontales, los canales de Volkmann. Es de notar que tanto entre las osteonas como en las superficies exterior e interior de la diáfisis se encuentran otras laminillas óseas, derivando de antiguas osteonas o no, dando al hueso cortical su gran resistencia [40][43].

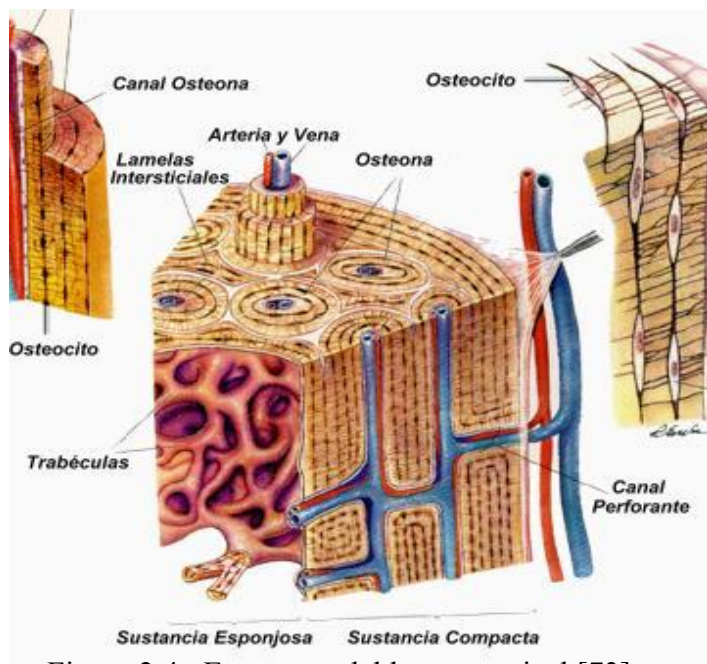
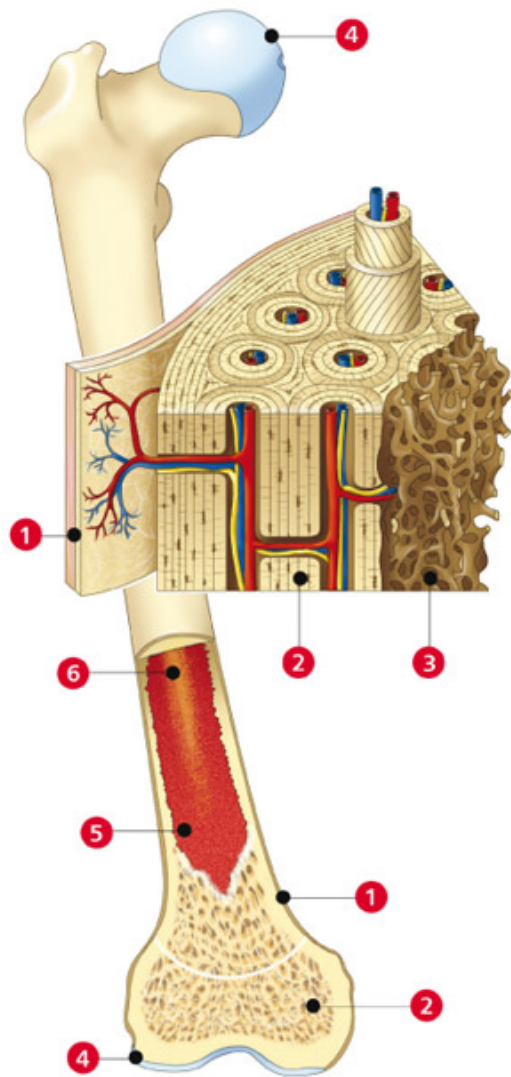


Figura 2.4 : Estructura del hueso cortical [73]

Además, tal como el hueso esponjoso, el hueso compacto presenta propiedades mecánicas íntimamente dependientes de la dirección de sollicitación del hueso y por lo tanto de la alineación de las osteonas. Su adaptabilidad y su densidad les procuran la resistencia necesaria para el sostén [40].

La estructura general del hueso se puede ver en la figura 2.5 :



- 1 Periostio : membrana fibrosa que cubre el hueso.
- 2 Hueso cortical
- 3 Hueso trabecular
- 4 Cartílago articular
- 5 Medula roja : produce los glóbulos blancos y rojos.
- 6 Medula amarilla : red llena de grasa.

Figura 2.5 : Estructura global del hueso [72]

2) Composición del hueso

La composición del hueso se puede dividir en dos fases una orgánica compuesta por mayor parte de la matriz extracelular y una fase inorgánica.

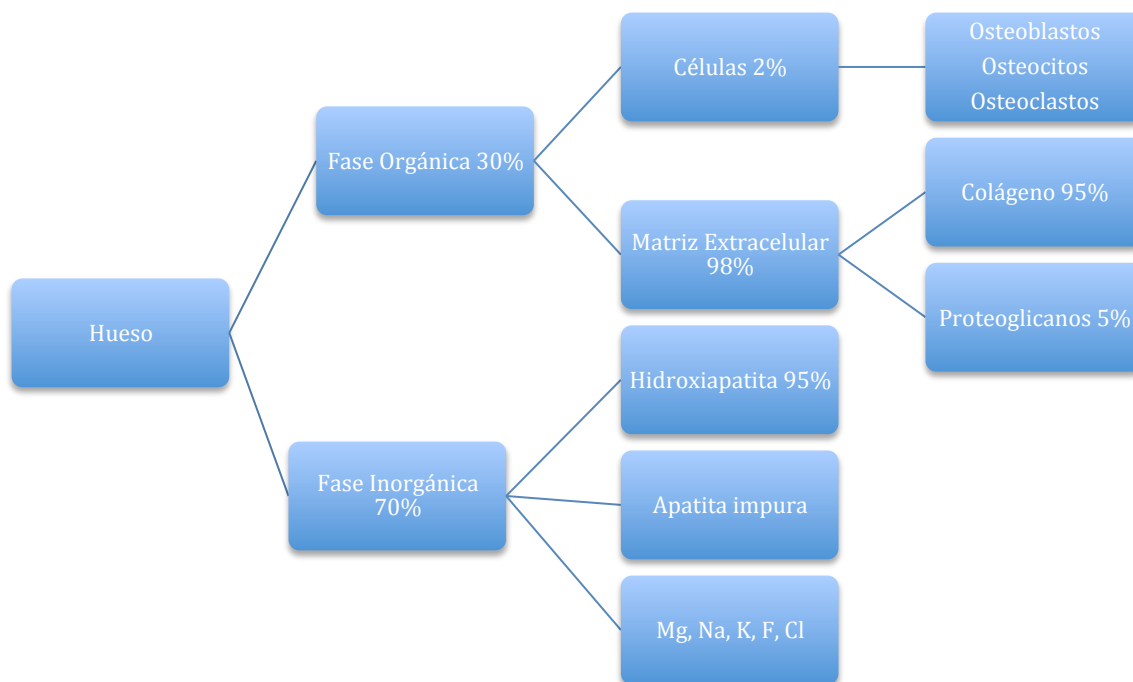


Figura 2.6 : Composición del hueso [40]

La fase inorgánica siendo principalmente cristales de fosfatos de calcio bajo forma de hidroxiapatita (de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) confiere al hueso su rigidez, y resistencia mecánica en compresión y cizalladura. De hecho ya que tienen las altas propiedades mecánicas de las cerámicas y sirven de refuerzos a la fase orgánica.

Los cristales se colocan entre las fibras de colágeno de la matriz extracelular dando al hueso su estructura de material compuesto. Las moléculas estructurales de colágeno o sea las proteínas las mas abundantes del cuerpo humano, se presentan mayormente bajo forma de fibras que se juntan para dar lugar a las osteonas. Son responsables de la flexibilidad y resistencia a la tracción del hueso.

El muy bajo porcentaje de células controla sin embargo la creación, degradación y regeneración ósea.

- Los osteoblastos sintetizan principalmente el colágeno óseo y otras proteínas y participan en la mineralización de la matriz extracelular con cristales de hidroxiapatita durante la fase de creación del hueso como en su remodelación. Se rodean de esta matriz hasta aislarse en osteocitos.

- Los osteocitos son osteoblastos derivados y representa la primera población de células óseas. Siendo aislados producen mucho menos matriz pero la regula controlando las actividades de los osteoclastos y osteoblastos.

- Los osteoclastos son responsables de la resorción ósea. Disuelven la hidroxiapatita y ataca la matriz secretando ácidos y ciertas enzimas. Las huecos así formadas se llaman lagunas de Howship. Actúan en sinergia con los osteoblastos para mantener la estructura ósea.

3) Remodelación ósea

El hueso no tiene una estructura fija sino que para adaptarse a las solicitaciones mecánicas que sufre, puede cambiar su tamaño, su forma y su estructura. La remodelación ósea se puede dividir en cinco etapas en las cuales se actúan los tres tipos de células presentados antes como se muestra en la figura 2.7.

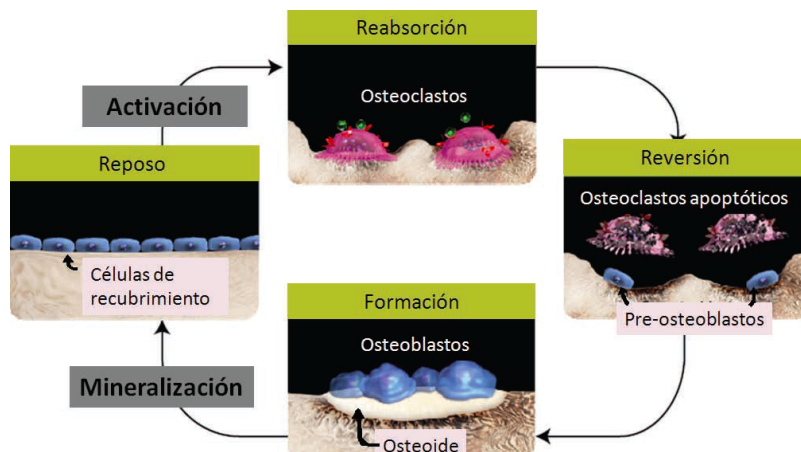


Figura 2.7 : Etapas de la remodelación ósea [74]

La fase de reposo : Los osteoblastos son inactivos y protegen la superficie del hueso.

La activación : Se liberan señales físicas y bioquímicas atrayendo macrófagos en la zona que hay que remodelar. En ese lugar se lleva a cabo la diferenciación hacia osteoclastos

La reabsorción : Los osteoclastos digieren los componentes orgánicos e inorgánicos del tejido óseo para formar las cavidades de Howship.

La reversión : Los osteoclastos mueren permitiendo que los macrófagos liberen factores de crecimiento para atraer a los osteoblastos.

La formación : Los osteoblastos movilizados rellenan la cavidad así formada con matriz colagénica antes de mineralizarla para dar lugar a nuevas osteonas y recubriendo la superficie del hueso. Al final de esta etapa, toda la superficie está cubierta y se regresa a la fase de reposo [40].

4) Consolidación de fracturas y defectos óseos

Cuando el tamaño de una fractura o de un defecto óseo es menor a un tamaño crítico, el hueso puede consolidarse solo mediante un proceso en 4 etapas.



Figura 2.8 : Etapas de la consolidación de fractura [74]

La formación de un hematoma o inflamación resulta en el movimiento del flujo sanguíneo hacia la lesión. La coagulación de la sangre ocurre mientras se liberan factores de crecimiento mediante la llegada de macrófagos que fagocitan los desechos acelulares.

Luego, los osteoblastos depositan osteoide en el callo de fractura (se llama así el sitio dañado) para empezar la reparación. En ese momento ocurre la osificación o sea mineralización del callo con la formación de hueso fibrilar.

Finalmente, la remodelación tiene lugar cuando se reorganizan gradualmente las fibras de colágeno formando hueso laminar (incluyendo una fase orgánica) con una mejor alineación de sus componentes para resistir más a las tensiones locales [40].

Pero en el caso de un defecto superior al tamaño crítico, este proceso no puede llevar al cabo de una reparación total del hueso y se necesita la incorporación de un injerto o la ayuda

de la ingeniería tisular.

Además es imprescindible controlar la angiogénesis para desarrollar un buen injerto ya que este fenómeno tiene un papel importante en la reparación ósea. De hecho la angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos previamente existentes. La angiogénesis de la placa de crecimiento y del callo de fractura óseo ha demostrado ser un punto clave para la osificación. La etapa intermedia que comporte la mineralización osteoblástica de esta osificación es inducida por la liberación de factores que tiene lugar durante la angiogénesis y por lo tanto después la llegada las células vasculares endoteliales a la zona de formación ósea. La importancia de la vascularización se ha comprobado también a través de estudios en los que la incorporación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) acelera la consolidación de la fractura, en tanto que, la incorporación de inhibidores de la angiogénesis detienen la consolidación de la fractura, la formación del callo de fractura y la formación del periosteo [44][45].

2.2. Células mesenquimales y su diferenciación

En el desarrollo de andamios biodegradables para ingeniería de tejidos, no hay solo que hacer un estudio fisicoquímico del material, aunque nos da varias informaciones sobre las propiedades mecánicas y la estructura del material ; un estudio de biocompatibilidad se necesita para estudiar la respuesta celular y comprobar la eficiencia del injerto in-vivo. Para efectuar esos ensayos, se van a usar células osteoprogenitoras proviniendo del mesénquima, por eso las llamamos células mesenquimales. Estas células tienen dos particularidades muy interesante para la ingeniería de los tejidos.

Primero presentan una gran tasa de autoreposición es decir que se pueden dividir de manera totalmente idéntica durante periodos largos. Y segundo, como las células madres, presentan plasticidad o sea se pueden diferenciar en varios tipos celulares. Es un fenómeno durante el cual la célula se especializa adquiriendo una función específica. Mediante algunos parámetros se intenta controlar la diferenciación de la célula para usarla como fuente de osteoblastos en nuestro caso aunque el proceso exacto de diferenciación no sea totalmente conocido. La figura 2.9 enseña el potencial de diferenciación de estas células.



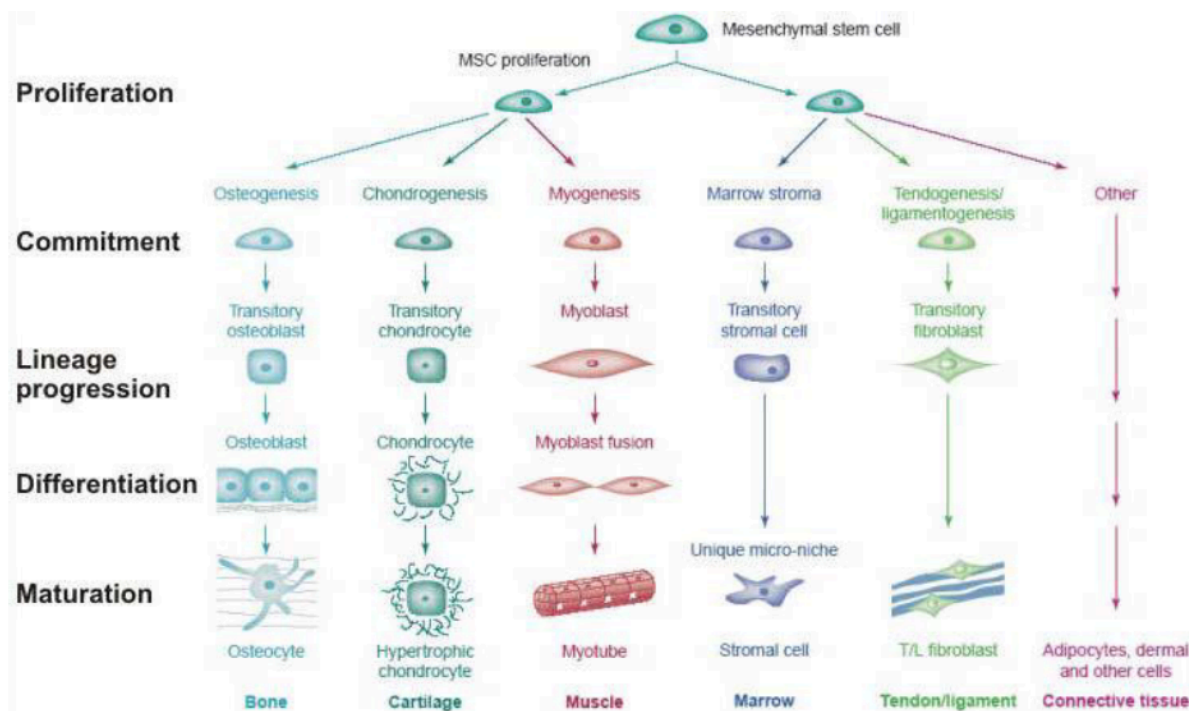


Figura 2.9 : Esquema del comportamiento de una célula mesenquimal.[75]

Se descubrió que estímulos físicos podrían determinar la manera de diferenciarse de las células mesenquimales [46]. Se ha demostrado en un estudio muy reciente que una carga mecánica favorece la liberación del gen que expresa la proteína osteopontina, que es una proteína relacionada con la diferenciación de las células óseas ; o sea que una carga mecánica favorece la diferenciación de las células mesenquimales en células óseas [47].

2.3. Materiales utilizados para la fabricación de andamios para regeneración ósea

1) Ácido Poliláctico

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático termoplástico, amorfo o semicristalino, de alta resistencia mecánica, de plasticidad térmica, y maleable muy usado en la industria alimentaria y en ingeniería tisular por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Se degrada por hidrólisis produciendo ácidos láctico y luego agua y dióxido de carbono. Las rupturas de cadenas producidas por hidrólisis provocan tanto una pérdida de estabilidad química como de integridad mecánica [48].

Hace parte de los biomateriales dichos reabsorbibles es decir que su

degradación es química y que su reabsorción se hace de manera controlada mientras es reemplazado por el tejido [49].

Es derivado de recursos renovable tal la harina de maíz o caña de azúcar. Su fabricación data de los años 1930 pero su coste elevado reservaba su uso al mediante médico. De hecho, existía solo una manera de producirlo : la policondensación del ácido láctico.

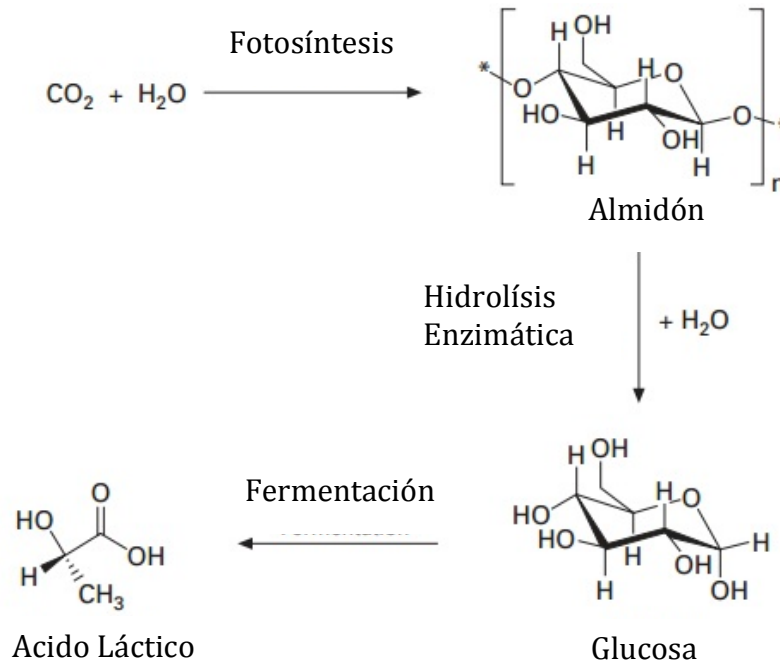


Figura 2.10 : Proceso de obtención del ácido láctico a partir de almidón.

El ácido láctico es una de las moléculas químicas más pequeñas cuya fórmula es $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$. Posee un carbono asimétrico y por lo tanto existe bajo la forma de dos esteroisómeros, el L-ácido láctico (levógiro) y el dextrógiro (D) mucho mas raro.

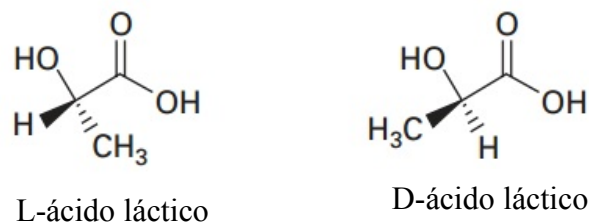


Figura 2.11 : Los esteroisómeros del ácido láctico.

Luego en los años 1950, se descubrió la lactida de misma fórmula que el ácido láctico, difiere en el hecho de que es el diéster cíclico del segundo. Es el producto de la

Luego se ha combinado el L y el D para crear el mesómero DL-ácido poliláctico. Es un polímero amorfo con bajas propiedades mecánicas pero presenta una excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Tiene una tasa de degradación alta y una temperatura de transición vítrea de 50-55° pero no tiene temperatura de fusión ya que es amorfo.

Finalmente se pueden co-polimerizar el L-ácido láctico y el DL-ácido láctico para combinar las ventajas de cada uno. Con el L/DL-ácido poliláctico se puede ajustar el porcentaje en peso de cada monómero para controlar las propiedades mecánicas como su tasa de degradación en función de la aplicación final del material. Un gran porcentaje de L aumentaría la cristalinidad y por lo tanto la resistencia mecánica mientras se reduciría el tiempo de degradación añadiendo DL [51].

Las propiedades mecánicas y térmicas de copolímeros DL-ácido poliláctico fueron investigadas por Buchatip et al. en 2008 [52].

Se han desarrollado copolímeros de alto peso molecular por polimerización por apertura de anillo de L y DL lactidas y resulta que presentan una temperatura de transición vítrea T_g , de fusión T_m y una cristalinidad mas baja que la del homopolímero L-ácido poliláctico.

Se ha mostrado que tan el módulo de Young como la resistencia a la tracción bajan con el porcentaje comonomero DL-lactida mientras su tasa de elongación máxima aumenta.

En el andamio para la regeneración ósea, nos interesa tener buenas propiedades mecánicas, por eso se ha elegido desarrollar este proyecto con un el LDL-ácido poliláctico con una tasa en peso de 95-5% respectivamente. Esta mezcla permite obtener una tasa de cristalinidad de unos 30%, una T_g de 54,7°C y una T_m de 154,2°C. En cuanto a sus propiedades mecánicas, posee un módulo de Young de 25 MPa y una resistencia a la tracción de 50 MPa [53].

2) Polietilenglicol

El polietilenglicol (PEG) es también un poliéster biodegradable, biocompatible y no tóxico muy usado en la industria producido por la reacción del óxido de etileno con el agua, etilenglicol o uno de sus oligómeros. Se prefiere a menudo partir del etilenglicol ya que se puede polimerizar con mejor control de la polidispersión. Además, es hidrófilo y tiene una solubilidad en agua muy alta. Su temperatura de fusión es de aproximadamente -165°C y su masa molecular varía entre 300 y 10 000 000 g/mol. Se escribe a menudo con una cifra



haciendo referencia a su peso molecular : un PEG con $n=9$ tendrá una masa molecular media de 400 Da y por lo tanto podrá ser notado PEG 400. Tal como el PLA, es un biomaterial reabsorbible.

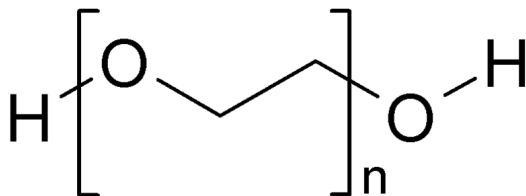


Figura 2.14 : Fórmula global del PEG ($n \geq 4$).

En este proyecto, el PEG será mezclado con PLA para servir de plastificante. El estudio de Mihir et al. pone en evidencia el efecto de un bajo porcentaje de PEG en una mezcla de PLA/PEG. Los termogramas de DSC enseñan que debajo de un 50% de PEG, este plastifica el PLA dándole más elongación y un módulo de Young más bajo, mientras encima de 50% de PEG, se aumenta la cristalinidad dando lugar a un módulo más alto y menos elongación a la ruptura. En cuanto a la resistencia a la tracción, esta baja linealmente cuando se aumenta el contenido de PEG [54].

Un estudio de degradación enzimática demostró también que la pérdida de masa era más importante al aumentar la concentración de PEG. De hecho debajo de 30% de PEG, es debida a la degradación enzimática del PLA mientras que encima de este porcentaje la disolución del PEG predomina. En caso de degradación hidrolítica, esta es debida a la combinación de ambas degradaciones para mezclas de PLA/PEG con un contenido de PEG de menos de 30% [54].

En este estudio se utilizó PEG para facilitar el procesado por RP del PLA. De hecho ha sido enseñado que debajo de 10% de PEG, se observa una baja de la T_g haciéndola pasar de 57,4°C para el PLA solo hasta 42,5°C para la mezcla PLA/PEG (90/10).[48] Navarro et al. han ensayado diferentes composiciones de PLA/PEG para llegar a la conclusión que 5% de PEG era suficiente para facilitar el procesamiento a baja temperatura ($T=40^\circ\text{C}$) sin modificar de manera excesiva el material en sí mismo [10].

3) Vidrio G5

Los fosfatos de calcio son materiales muy usados en la ingeniería tisular ósea por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad y su composición similar a la de la hidroxiapatita. Se han desarrollado tras los últimos años numerosos materiales de este tipo : cerámicas, vitrocerámicas y vidrios biológicos.

Los vidrios bioactivos de fosfatos de calcio son reabsorbibles, se disuelven completamente y se puede controlar su velocidad de degradación haciéndola variar de unos días hasta varios meses según su composición. Sus unidades estructurales son los tetraedros de fosfatos PO_4 que forman largas cadenas o anillos y resultando en una red vítrea. En este sentido, los vidrios de P_2O_5 presentando una gran tasa de degradación y numerosos sistemas han sido desarrollados para mejorar su estabilidad química.

Vidrios en el sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ han sido estudiados pero son demasiados solubles para aplicaciones que necesiten mas estabilidad en el tiempo [55][56].

El vidrio G5, usado en este proyecto, se obtiene a partir de CaCO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y Na_2CO_3 . Los polvos de los reactivos son mezclados y fundidos a aproximadamente 1300°C durante 3 horas antes de ser colado en un molde precalentado a una temperatura poco debajo de la T_g del sistema (400°C). Luego se hace un recocido a la T_g del vidrio antes de dejarlo enfriarse lentamente eliminando por lo tanto las tensiones internas.

Mediante la adición de ciertos óxidos metálicos como Al_2O_3 , ZnO_2 , Fe_2O_3 y TiO_2 , se puede estabilizar el material. El estudio de Navarro et al. muestra que la adición de TiO_2 en el sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2$ aumentaba la T_g mejoraba el modulo elástico y la durabilidad química del material. De hecho, Ti^{4+} tiene un pequeño radio iónico y una carga eléctrica larga lo que le permite penetrar los intersticios de la red y reforzar por lo mismo los enlaces entre las diferentes cadenas [57].

El G5 que se usa en este proyecto es hecho fosfato de calcio de composición $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$ con los porcentajes molares siguientes 44,5-44,5-6-5 respectivamente.

El P_2O_5 juega el papel de formador de red mientras los otros componentes la modifican.

El CaO y el NaO permiten un leve control de la estabilidad y de las propiedades mecánicas del vidrio mientras el TiO_2 mejora considerablemente ambas cosas [56].

Por otra parte, la degradación del G5 implica la liberación de algunos iones como el P^{5+} , Na^+ , Ti^{4+} y Ca^{2+} . La liberación del Ca^{2+} confiere al vidrio su bioactividad : activa unos sensores del hueso llamados CaSR (Calcium Sensing Receptor) y promueve la proliferación, diferenciación en osteoblastos, y movilización de células tal las Células Progenitoras



Endoteliales (EPC). Además, el calcio activa la producción de factores de crecimiento como el VEGF factor de crecimiento endotelial vascular, dentro de las EPC permitiendo la angiogénesis y formación de vasos sanguíneos [58].

Además, el calcio activa la producción de factores de crecimiento tal el VEGF dentro de las EPC permitiendo la angiogénesis y formación de vasos sanguíneos.

Finalmente, un estudio realizado por Serra et al. demuestra que la adición de estas partículas a la mezcla polimérica aumentaba de manera significativa la hidrofiliidad y la rugosidad del andamio volviéndolo aun mas propicio para el crecimiento celular. [10]

2.4. El Rapid Prototyping (nozzle-based printing)

El problema de la mayoría de los andamios desarrollados con las técnicas usuales que han sido introducidas tras los 30 últimos años es que los andamios así fabricados tienen una geometría irregular, malas propiedades mecánicas y trabajan difícilmente con muchos materiales o compuestos [59] [60].

La técnica de Rapid Prototyping también llamada "nozzle-based printing" usada en este proyecto intenta paliar estos problemas mediante la creación de andamios a partir de datos de Diseño Asistido por Ordenador (DAO) tal como se ha mencionado anteriormente [61].

De hecho, este proceso permite tener una total libertad de forma y de tamaño encima de un gran control de la distribución y diseño de los poros y su sistema de deposición de material capa por capa posee una gran precisión y reproductibilidad [62].

Ya que se usa datos de DAO y una máquina con una gran resolución, esta técnica permite un gran control de la estructura compleja del andamio y de la interconectividad de los poros de manera fiable y reproducible [64].

Se puede también, con ciertas máquinas de RP, trabajar con células vivas que pueden ser colocadas directamente en el andamio impreso sugiriendo la adición anterior de sustancias biológicas en el material [63].



3. Materiales y métodos

3.1. Fabricación de las muestras

1) Preparación de la solución polimérica

En este proyecto, se utilizaron mezclas de copolímero L-Láctico/DL-Láctico en proporción 95/5 respectivamente mezclado con un 5% de PEG de masa molecular $M_w=400\text{Da}$. Se han hecho dos tipos de materiales, uno sólo con PLA y PEG, y el otro añadiéndole un 50% de partículas de vidrio de fosfato de calcio estabilizado con titanio de fórmula $44.5\text{P}_2\text{O}_5-44.5\text{Ca}_2\text{O}-6\text{Na}_2\text{O}-5\text{TiO}_2$ que llamamos G5. Las partículas añadidas fueron de tamaño es inferior a $40\mu\text{m}$.

Material	Matriz polimérica (p/p%)	Partículas de G5 (p/p%)
PLA/PEG	PLA95/PEG5	-
PLA/PEG/G5	PLA95/PEG5	(PLA/PEG) 50/G5 50

Figura 3.1 : Composición de los materiales usados

A continuación, se preparan soluciones de 20mL de 7%p/v de polímero y polímero/vidrio en cloroformo para ser usado en la máquina de rapid prototyping.

2) Fabricación de los andamios por rapid prototyping

Los andamios en 3D han sido fabricados por deposición de las mezclas poliméricas gracias a la máquina de rapid prototyping Engineering 3Dn-300 de Sciperio/nScript. Inc., Orlando, Florida. La máquina posee un sistema de jeringa con una bomba de inyección para regular la presión y por lo tanto depositar el material sobre varios sustratos con mas facilidad. En este estudio, se usó una rejilla de metal cubierta de PLA como sustrato, así la primera capa adherirá al sustrato, se alcanzará una mejor precisión, y permitirá que el andamio pegue al sustrato a lo largo del proceso.

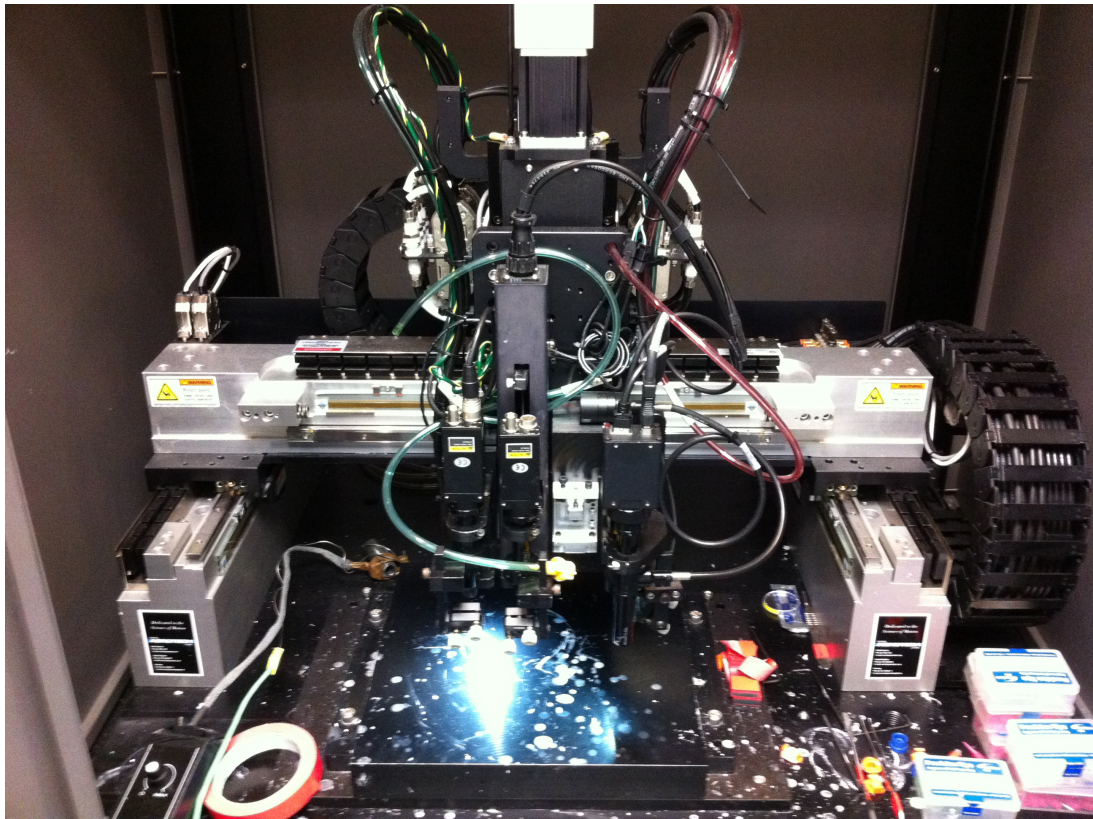


Figura 3.2 : La máquina de rapid prototyping Engineering 3Dn-300.

Además usa un programa de DAO para construir la estructura 3D capa por capa siguiendo el modelo elegido y un programa de control que permite gestionar la presión de la bomba, la velocidad de deposición, la temperatura de la cubierta la jeringa y el recorrido de esta ultima según los tres ejes [65].

Una vez optimizados los parámetros de impresión (una velocidad de deposición de 2mm/s y una presión de 40 hasta 80 psi) se eligió un diseño ortogonal desplazado con poros cuadrados como lo enseña la figura 3.3. El diseño original preveía un tamaño de poro de 500 μ m en vista axial [10].

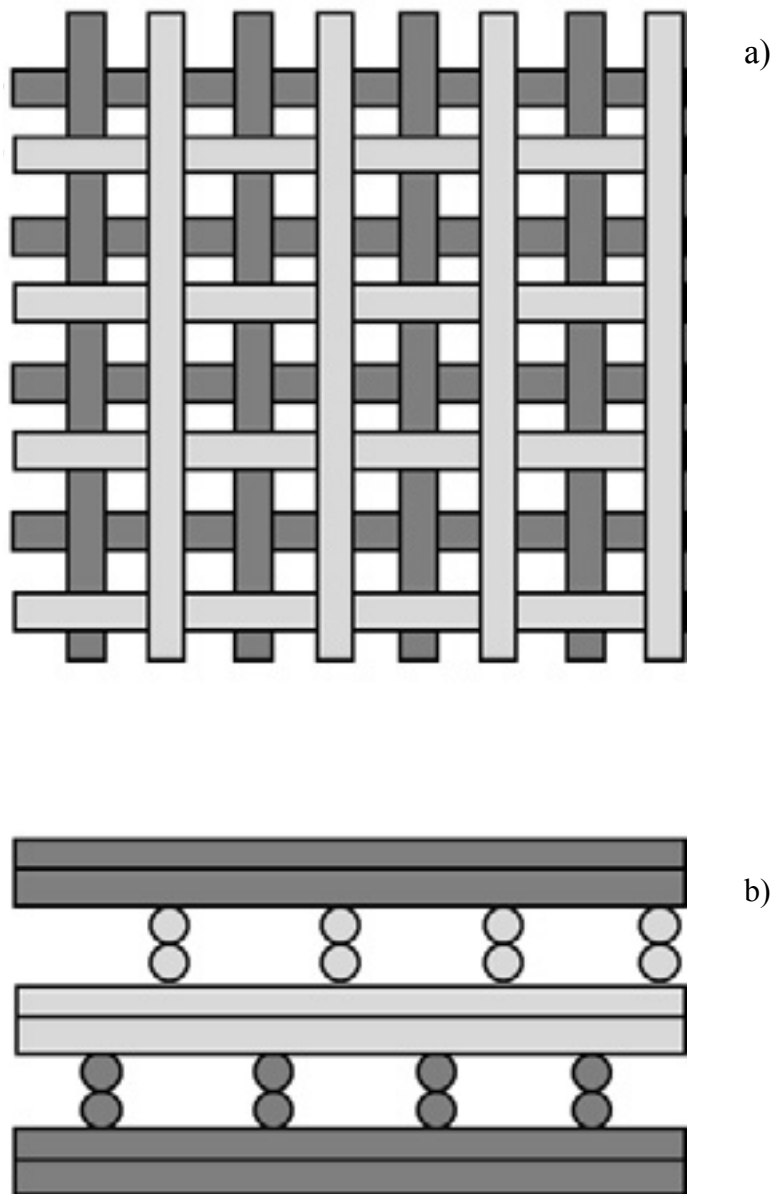


Figura 3.3 : Estructura ortogonal desplazada a) vista superior b) vista transversal [10]

Se prepararon unas jeringas de 20mL de solución polimérica y de polímero/vidrio y puesto en la maquina para que se caliente a unos 40-45° gracias a la chaqueta. Es suficiente para alcanzar la T_g de la mezcla sin que el cloroformo hierva (su temperatura de ebullición siendo 61°C) y que se evapore casi al depositar el material. Las jeringas usadas llevaban agujas G27 de 200 μ m de diámetro. Se ha elegido una velocidad de deposición de 2mm/s con una presión de 40 hasta 80 psi.

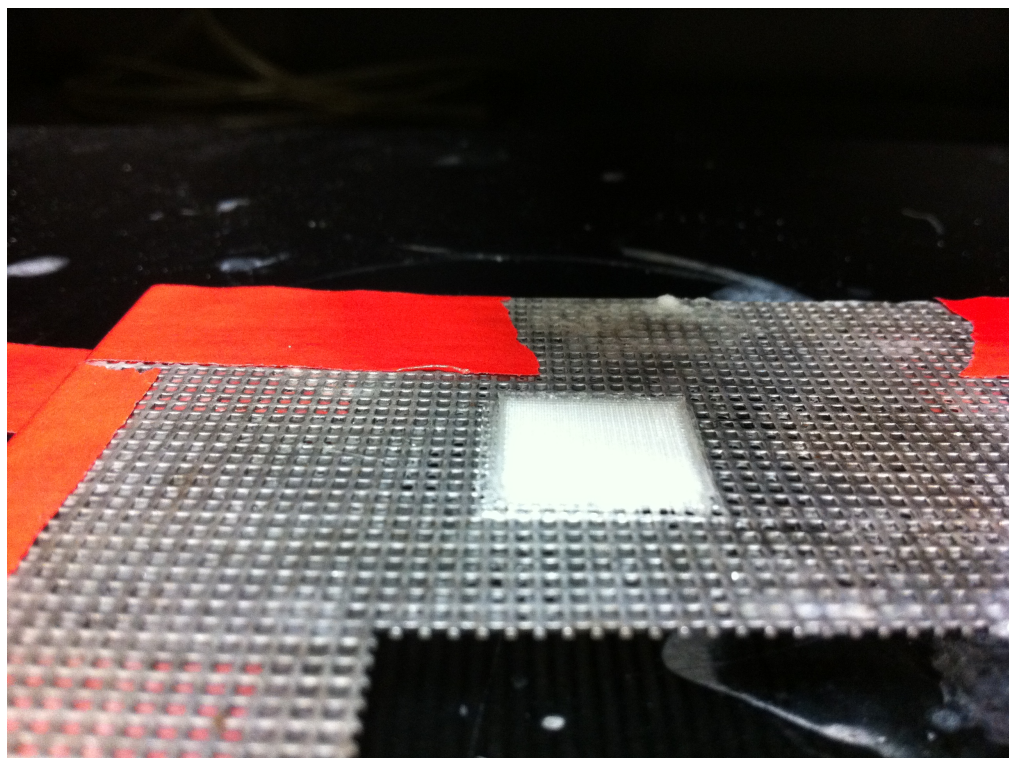


Figura 3.4 : Andamio de PLA fabricado por rapid prototyping.

3) Caracterización de los andamios

La caracterización fisicoquímica de los andamios que se usan en este proyecto ha sido llevada a cabo por Serra et al. poco antes de empezar mi proyecto y comporta un estudio de la estructura tal como un estudio de las propiedades térmicas y mecánicas de los andamios de PLA/PEG y PLA/PEG/G5. Permite saber si el diseño del material es apropiado al crecimiento celular y a su función de andamio [10].

Estructura

La morfología de la estructura 3D ha sido estudiado por microscopia electrónica de barrido (SEM, JEOL JSM 6400, Tokyo, Japan) para evaluar entre otras cosas, los cambios de porosidad entre la teoría y la realidad. Debido a la evaporación del solvente, las barras miden finalmente de 70 hasta 80 μ m de anchura y se han formado poros de 350-400 μ m en vista axial.

En el caso de los andamios conteniendo G5, se ha podido ver una distribución bastante homogénea de las partículas dentro de la matriz polimérica. Además la evaporación del solvente permitió no solo la creación de poros macrométricos, como era previsto en el diseño

original, sino también micrométricos y nanométricos.

En cuanto a la porosidad global, el diseño original preveía unos 85-87% con una distancia entre las barras de 350 y 400μm respectivamente. Debido a la fusión de las barras y a su superposición, el diámetro de estas cambia. El estudio teórico supone que eso no ocurre y por lo tanto que el diámetro de las barras y el espacio entre las capas es igual.

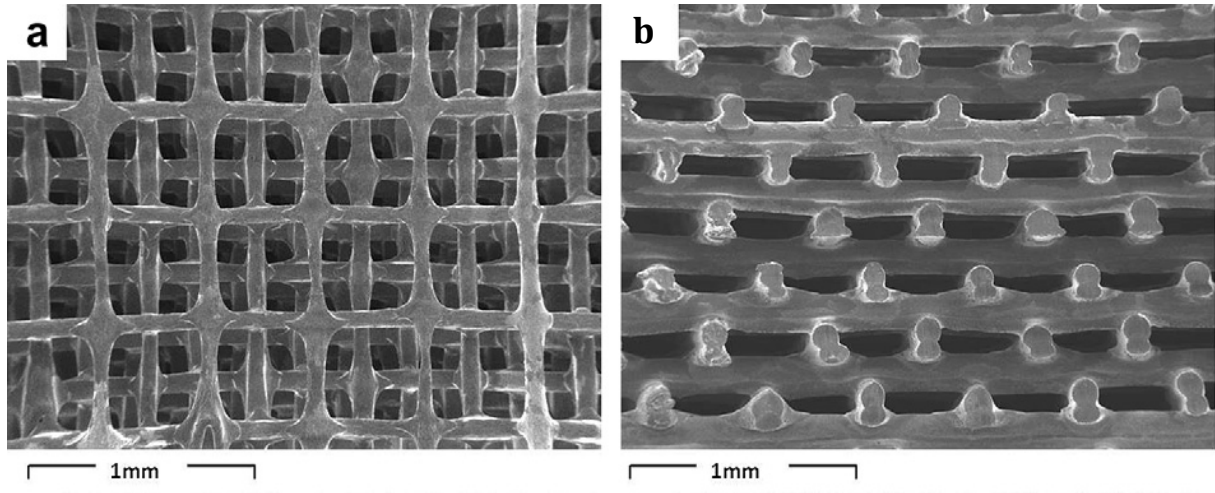


Figura 3.5 : Fotos de SEM de un andamio de PLA

a) vista superior b) vista transversal [10]

Se ha considerado un andamio cubico normalizado y medido su porcentaje de volumen de porosidad teórico % $V_{\text{olteórico}}$ con la siguiente fórmula :

$$\% Vol_{\text{teórico}} = (V_a - V_r) / V_a \times 100\% \quad (1)$$

donde

$$V_r = \text{volumen real (mm}^3\text{)} = V_b N_b N_c = (\pi \cdot \varnothing^2 / 4) \cdot A_n N_b N_c$$

$$V_b = \text{volumen de la barra (cilíndrica) (mm}^3\text{)}$$

y

$$V_a = \text{volumen aparente (mm}^3\text{)} = A_n P_r A_l$$

$$A_n = \varnothing N_b + D (N_b - 1)$$

D = distancia entre las barras

$$A_l = \varnothing N_c$$

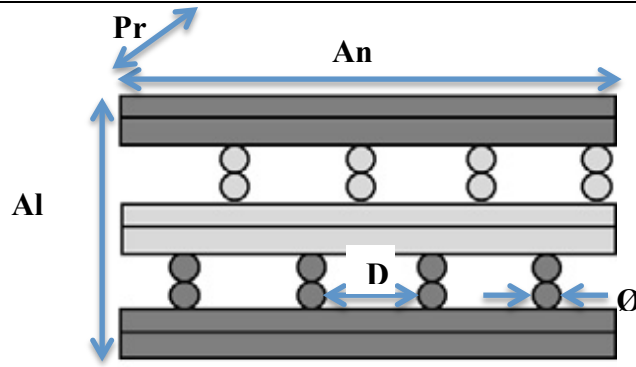


Figura 3.6 : Diseño esquemático de los andamios y dimensiones [10]

Por lo tanto,

$$\%Vol_{teórico} = (1 - (\varnothing^2/4)\pi N_b N_c / (4P_r A_l)) (2)$$

donde \varnothing , A_n , P_r , y A_l diámetro se refieren respectivamente a la anchura (longitud) de las barras, la profundidad y la altura del andamio en milímetros. Además, N_b representa el número de barras (cilíndricas) por capa mientras N_c es el numero de capas por andamio.

La porosidad de la estructura final ha sido calculada usando una técnica relacionando el peso con el volumen del andamio :

$$\% Vol_{medido} = (1 - \rho_{andamio} / \rho_{material}) 100\%. (3)$$

donde

$$\rho_{andamio} = \text{densidad aparente del andamio (g/cm}^3\text{)} = m / (A_n P_r A_l).$$

Y por lo tanto,

$$\% Vol_{medido} = (1 - m / (\rho_{material} A_n P_r A_l)) 100\%, (4)$$

Con m , masa del andamio (g) y $\rho_{material}$ representa la densidad del material (g /cm³).

En el caso de la mezcla polimérica, $\rho_{PLA/PEG}=1,231$ g/cm³ mientras la del vidrio G5 se puede calcular sabiendo $1/\rho_{material} = p\%PLA/PEG / \rho_{PLA/PEG} + p\%G5/\rho_{G5}$. Y por lo tanto $\rho_{G5}=2,903$ g/cm³.

Finalmente, los andamios procesados presentan poros totalmente interconectados con una porosidad de aproximadamente 66% para la mezcla polimérica y 60% para el compuesto polímero/vidrio.

El análisis de la microestructura ha sido hecho escaneando un andamio polimérico y un compuesto usando una maquina de tomografía computarizada microCT X-Tek HMX225 de Digisens con una resolución vóxel de 8.8.8 μm^3 . La reconstrucción en 3D ha sido

desarrollada por ordenador usando el programa Mimics 14.0 (Materialise, Leu-Ven, Bélgica) para determinar la distribución de las partículas de G5 tal como la porosidad del andamio.

La reconstrucción permitió confirmar los datos de porosidad obtenidos por la ecuación precedente, de hecho se ha visto una porosidad total de 65% para la mezcla polimérica y 60% para el material compuesto. Además el modelo 3D obtenido presenta poros totalmente interconectados y una distribución de los 43% de partículas de vidrio homogénea.

Propiedades mecánicas y térmicas

Las propiedades mecánicas de los andamios fueron estudiadas mediante una máquina universal de ensayos (MTS-Bionix 858, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, EEUU) con una celda de carga de 10N. Las muestras fueron ensayadas sin precarga a una velocidad de 1mm/min. Los datos de tensión/deformación se han sido deducidos de las medidas de desplazamiento de carga en cuanto al módulo de compresión, su determinación fue basada en la pendiente de la curva de tensión/deformación en la región elástica.

Tres andamios de cada composición fueron diseñados por DAO, cortados y normalizados para que midan 5x5x5 mm³ y luego ensayados.

Los resultados obtenidos mostraron que el módulo medio de compresión de la mezcla polimérica de PLA/PEG (95/5) es de unos 92 MPa mientras el del material compuesto sube hasta 100 MPa.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC-2910, TA Instruments) se usó para comparar las propiedades térmicas del material antes y después su procesamiento. Se han producidos andamios por deposición 3D para ensayarlos con la DSC (5-10mg). Fueron calentados desde los 10 a los 200°C, luego enfriados a -25°C y finalmente recalentados hasta los 200°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min en crisol de aluminio y usando nitrógeno como gas de purga.

Las curvas de DSC así obtenidas permitieron determinar la temperatura de transición vítrea T_g , de cristalización T_c y la tasa de cristalinidad de los andamios X_c sabiendo que todos los datos han sido sacados de las termografías correspondiendo al segundo ciclo de calentamiento.

Los resultados confirmaron que la tasa de cristalinidad no cambia mucho con el procesamiento. De hecho, después el procesamiento del PLA/PEG (95/5), sube de 2,1 hasta



2,4%X_c, y su temperatura de transición vítrea de 40 hasta 44,6°C.

4) Preparación de los andamios para los ensayos

Ya que los andamios así fabricados miden 15x15x3,9= 877,5mm³ por lo tanto no caben en los pocillos de las placas de cultivos. Además, la primera capa que ha sido imprimida era más gruesa ya que adhería sobre la rejilla cubierta de PLA que servía de sustrato. Se quitó primero el fondo del andamio y luego se cortan cilindros con un sacabocados para obtener cilindros de 3,9mm de diámetro, 3,9mm de altura y 186,4 mm³ de volumen total.

3.2. El cultivo celular

El cultivo celular es la técnica mediante la cual las células pueden crecer, proliferar y diferenciarse in vitro. De esta forma, células extraídas del huésped pueden ser multiplicadas in vitro, en condiciones controladas. El cultivo de células animales empezó a ser una técnica rutinaria de laboratorio durante los años 50, pero el concepto de mantener líneas de células vivas separadas del tejido de origen fue descubierto en el siglo XIX.

En este proyecto, hemos decidido trabajar con células mesenquimales de rata ya que tienen una alta sensibilidad y un gran poder de regeneración. Además tienen la particularidad de poderse diferenciarse a diferentes tipos de células como osteoblastos en nuestro caso. Mediante las señales que le envía el andamio según su estructura, sus propiedades superficiales y los iones que libera, la diferenciación de estas células se puede por lo tanto controlar.

El cultivo celular es una rutina bastante sencilla pero necesita un gran cuidado y pulcritud en su manipulación. Ya que las bacterias amenazan contaminar las células que se cultiven, las manipulaciones siempre se hacen en ambiente estéril. Es decir, que se manipulan siempre bajo una campana, con guantes, bata, cubre zapatos y cubre pelo.

Antes de realizar los estudios de proliferación y diferenciación, se tiene que cultivar las células que vamos a colocar para multiplicarlas, contarlas y poner el número deseado en cada material.

La rutina del cultivo se puede dividir en 4 etapas :

1) La descongelación



Las CMr (células mesenquimales de ratón) que se usaron en este proyecto ya han sido extraídas y se encuentran almacenadas en criotubos en un baño de nitrógeno líquido a -196°C . De hecho el material genético se estropearía encima de -130°C . Encima, ya que las células contienen una gran parte de agua, se necesitan conservar con un medio de congelación que previene la formación de cristales de hielo que podrían romperlas. El medio de congelación es compuesto un 90% de FBS (Fetal Bovin Serum, Invitrogen, Grand Island, USA) y dimetil sulfóxido (DMSO).

El FBS (Fetal Bovine Serum) es un suero extraído del plasma de bovino y es el suero más usado como suplemento a medios de cultivo celulares ya que tiene un bajo contenido en anticuerpos y un alto contenido en factores de crecimiento. Es compuesto mayormente de albumina pero contiene una rica variedad de otras proteínas que permiten a las células de sobrevivir y crecer.

El DMSO es utilizado como crioprotector ya que se pone en lugar del agua y reduce por la tanto la muerte celular causado por la formación de cristales de hielo durante la congelación. Sin embargo, es tóxico a temperatura ambiente y se tiene que quitar a principios de las manipulaciones con las células para que no se mueran.

El protocolo para la descongelación es el siguiente :

Primero se coge un criotubo de 1mL con la suspensión celular, es decir las células (aproximadamente 1millión por criotubo) y el medio de congelación (90% de FBS y 10% de DMSO). Se descongela en un baño a 37°C . Mientras tanto, se rellena un flascón con 14mL de medio de cultura y luego se siembran las células con la suspensión en el flascón. Se pone normalmente menos medio pero ya que el DMSO es tóxico se suele poner un exceso de medio para diluirlo. Finalmente se pone el flascón en una incubadora a 37°C , temperatura ideal de cultivo de células, durante 24h máximo después de las cuales habrá que cambiar el medio.

2) El cambio de medio

Al cabo de 24h, se cambia el medio para quitar el DMSO. El medio de cultivo depende de las células utilizadas, cada tipo de células tiene su propio medio sabiendo que el suero es el componente mas específico de la mezcla. Les procura los nutrientes necesarios



para su sobrevivencia y su crecimiento. Ya que al cabo de unas horas las células se adhieren en la superficie inferior del flascón el cambio de medio resulta solo en quitar el medio antiguo aspirándolo y poner medio fresco sin despegarlas. Por eso los líquidos siempre se echan y se aspiran por la esquina del flascón.

Para el cultivo de células CMr, se usa una mezcla de Advanced Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (Adv. DMEM), FBS, L-Glutamina, y P/E, penicillin en las proporciones 83/15/1/1 respectivamente.

El Adv. DMEM (Invitrogen, Grand Island, USA) ha sido desarrollado por Harry Eagle con objetivo mantener células de un tejido en un cultivo in vitro. Es un medio básico conteniendo aminoácidos típicos, glucosa, sales y vitaminas para el crecimiento celular. Además, tiene un indicador de pH que le da su color rosa : los residuos liberados por las células mientras se alimentan son ácidos, y cambian el color del medio a amarillo. Por lo tanto, un cambio de color hacia amarillo es señal que no quedan muchos nutrientes y que es tiempo para cambiar el medio.

El FBS (Invitrogen, Grand Island, USA) contiene los nutrientes necesarios al crecimiento celular.

La L-Glutamina es un aminoácido que sirve de fuente de energía para las células y ayuda su crecimiento.

El P/E, penicillin (Invitrogen, Grand Island, USA), es una solución antibiótica de penicilina y estreptomycin que reduce las probabilidades de contaminación de las células por bacterias.

El protocolo para el cambio de medio es el siguiente :

Se quita el medio antiguo del flascón. Se añade 5mL de PBS (Phosphate Buffered Saline (Invitrogen, Grand Island USA)), que es una sustancia tampón que permite mantener el pH (7,4) pero en el cultivo celular, sirve también para limpiar el flascón por ejemplo. Es compuesta de 3.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl.

En este caso, el PBS se añade y se retira poco después para quitar con cuidado los residuos de células, el medio antiguo, y las posibles células muertas. Luego se añade 10mL de medio fresco y se vuelve a poner el flascón en el incubador a 37°C.

Se repite esta etapa aproximadamente cada dos días hasta que las células hayan colonizado la superficie y llegado a confluencia. La confluencia representa el momento en el que las células se han divididas de tal manera que no queda espacio suficiente en el flascón y por lo tanto empiezan a morir en vez de multiplicarse. Es el momento ideal para la etapa



siguiente.

3) La Tripsinización o pase de las células

Las células que se usan en el proyecto han sido extraídas y cultivadas varias veces y el pase resulta en el número de veces que han sido manipuladas. Cuando no sobra espacio suficiente en el flascón, se transfiere una parte de las células cultivadas para ponerlas en otro contenedor vacío con medio fresco. Cultivándolas así, las células tardan más tiempo ya que se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de confluencia.

Primero se quita el medio y se limpia el flascón con PBS como si se quisiera cambiar el medio. En vez de poner medio nuevo, se añade una sustancia que actúa para despegar las células ya que adhieren en la superficie del flascón, la tripsina.

La tripsina es una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas por hidrólisis. Ya que la adhesión celular es debida a este tipo de enlaces, la tripsina permite despegarlas en poco tiempo pero hay que manipularla con cuidado ya que es citotóxica.

Las manipulaciones se dan de la siguiente manera :

Se añade 5mL de tripsina al flascón y se pone al incubador durante 5min como máximo. Es suficiente para despegarlas totalmente sin dañarlas. En este momento, se supone que se hizo un pase y por lo tanto si las células que se habían cogido ya habían sido manipuladas un número de pase X, ahora sería X+1.

Luego se diluye el medio añadiendo 5mL de Adv DMEM para parar la reacción de la tripsina, se pasa la suspensión a un tubo y se centrifuga para quitar la tripsina.

Se diluye de nuevo en cualquier cantidad de medio y las células se pueden ahora sembrar en otro flascónes, placas, andamios... Pero antes de todo hay que contarlas para saber cuantas se siembran.

4) El conteo celular

Se cogen 10 μ L de la suspensión para ponerlos en una cámara Neubauer. Típicamente, es una placa de microscopio con rayas como lo enseña la figura 3.7.



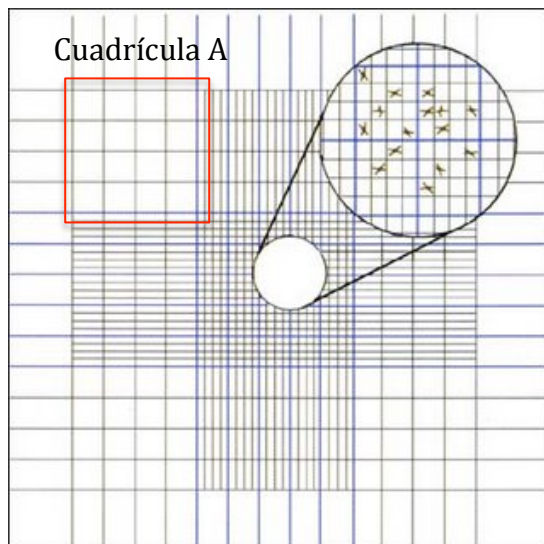


Figura 3.7 : Representación de la cámara Neubauer.

Cada cuadrícula como la A tienen 16 cuadrículas mas pequeñas dentro de las cuales se pueden ver células. Sabiendo el volumen de cada cuadrícula de tipo A, se cuentan las células de las 4 grandes cuadrículas tipo A. Se hace luego el promedio de estos valores dando un valor medio de células por cuadrícula tipo A. La concentración media en células dentro de la suspensión es el valor medio calculado por cuadrícula dividido por el volumen de la cuadrícula es decir $0,1 \times 0,1 \times 0,01 = 0,0001 \text{ mL}$. Por lo tanto se puede escribir, concentración de células = $\frac{\text{número de células} \times 10000}{\text{número de cuadros}}$.

5) Preparación de los andamios y siembra

Con el fin de esterilizar los andamios, éstos se dejan en un baño de etanol 70% durante 5 minutos bajo campana. Se repite esta operación una vez cambiando el baño antes de aclararlos haciendo dos lavados sucesivos con PBS (Phosphate Buffered Saline). Luego se siembra el material en placas antiadherentes de 24 pocillos, dejándolo 24h con el medio de cultivo para facilitar la adhesión celular.

Se sembraron 50 000 células en un volumen de aproximadamente de $10 \mu\text{L}$ de suspensión celular sobre los andamios y se dejan dos horas en el incubador a 37°C antes de añadir medio de cultivo para llegar hasta un volumen total de $600 \mu\text{L}$ por pocillo.

Para cada ensayo, se sembraron células directamente sobre pocillos en placas de cultivo normal y antiadherente como controles :

Se sembraron 3 pocillos con 50 000 células en la misma placa antiadherente que los

andamios para controlar si las células no se adherían y crecían en la superficie de la placa y aumentaban por lo tanto los resultados de biocompatibilidad del andamio. Y otros 3 pocillos de células con 50 000 células sembradas en una placa Corning 24 pocillos de superficie no tratada para aportar antiadherencia. Las células pueden entonces crecer y se puede controlar si hay una anomalía en su crecimiento, y si había problema con la línea celular empleada. Para cada material y tiempo de estudio, se usaron 3 pocillos.

3.3. Los ensayos de biocompatibilidad

1) Ensayo de adhesión : Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia permite observar las células que se han adherido al andamio marcando el núcleo y la membrana plasmática usando dos marcadores fluorescentes de distintos colores. Así, mirando las muestras con un microscopio de fluorescencia, se aprecia de manera cualitativa el número de células presentes y su migración dentro del andamio.

El proceso se puede descomponer en 4 etapas, la fijación, el proceso, la permeabilización y el bloqueo/inmuno.

Para este ensayo, se sembraron 3 pocillos de cada material (PLA/PEG y PLA/PEG/G5), 3 controles material y 3 control células. Se ha realizado el proceso después de 3 y 14 días de cultivo.

Fijación

Una etapa de fijación permite en primer lugar de fijar las células en una posición única para impedir sus movimientos y observarlas. Generalmente se fijan las células con paraformaldehído (PFA) al 3%, porque conserva la estructura citoesquelética. También se pueden usar: metanol, etanol o acetona como métodos alternativos, con ciertos anticuerpos dan mejores resultados.

Para preparar el fijador hay que mezclar:

- 760µl PFA 16%. Calentar el PFA a 60°C unos minutos, para solubilizarlo. (Paraformaldehyde (DAC) PRS-CODEX, Panreac).
- 240µl de sacarosa 1M, 0.3423g de sacarosa en 10ml de agua Milli-Q. (Sucrose, SigmaUltra, pH 5.5-7.5, >99.5%, Sigma).
- 2ml de PBS.



- 1ml agua Milli-Q.

Se obtienen 4ml de fijador al 3% de PFA y se conservan luego en la nevera.

Se necesitan también :

- PBS-gly (Glycine, BioUltra, for molecular biology, >99.0%, Fluka). Disolver 0.15g de glicina en 100ml de PBS y se conserva a 4°C. Se usa para los lavados, la glicina amortigua la fluorescencia de las células.
- Si es necesario, PBS-gly-azida sódica (Sodium Azide, purum p.a., >99%, Fluka). Preparar una solución al 0.2% de azida sódica, en agua mili-Q. Añadir 4µl de azida sódica al 0.2% en 2ml de PBS-gly. Se usa para conservar las muestras.

Procedimiento

Una vez estos productos son preparados, hay que recoger las células y lavar 2 veces con PBS-gly durante 5 minutos. Las células pueden estar varias horas a temperatura ambiente en estas condiciones. Luego cubrirlas con el fijador 10-30 minutos a 4°C antes de lavarlas 2 veces durante 5 minutos con PBS-gly frío.

En este punto, se puede parar la reacción, poniendo PBS-gly-azida sódica y dejando las muestras a 4°C para hacer las etapas siguientes en otro momento.

Permeabilización

Ya que el marcador DAPI tiene que alcanzar el núcleo para marcarlo, se hace una etapa de permeabilización mediante un detergente. Se tiene que permeabilizar 10' con Triton X-100 al 0.05% en PBS-gly antes de lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS-gly. Disuelve la membrana de todos los orgánulos incluso el núcleo y las proteínas de la membrana pueden por lo tanto ser dañadas.

Bloqueo e inmuno

En esta etapa se van a añadir los componentes fluorescentes por lo tanto se tiene que trabajar en oscuridad. Se tienen que incubar las células con phalloidin, dilución 1/500 en PBS-gly, durante 8 minutos. La phalloidin marcada con rodamina de color roja permite ver los cito-esqueletos

A continuación se añaden, 2µl de DAPI (2mg/ml) durante 2 minutos antes de lavar 3 veces durante 5 minutos con PBS-gly.



Observación

Con unas pinzas se montó el material sobre un portaobjetos y se observó la muestra en el microscópico o en la lupa de fluorescencia. Se observaron los andamios en su globalidad, visto desde arriba y abajo para ver la distribución de las células. Luego se hicieron cortes horizontal y transversal de los andamios para averiguar si las células han colonizado todo el andamio.

2) Ensayo de proliferación : AlamarBlue

El AlamarBlue es un ensayo de viabilidad celular basado en el poder reductor de las células para convertir resazurin en resofurin, una molécula fluorescente.

El componente activo del kit AlamarBlue, la resazurin, es no cito-tóxico, de color azul, no fluorescente y penetra en las células para ser reducido en resofurin produciendo una fluorescencia roja muy viva [66].

Las células vivas reducen en continuo la resazurin generando por lo tanto unas medidas cuantitativas del número de células vivas presentes en el medio y informaciones sobre la citotoxicidad de los materiales usados. Además ya que no es destructivo, se puede proceder a ensayos de larga estancia en las mismas muestras.

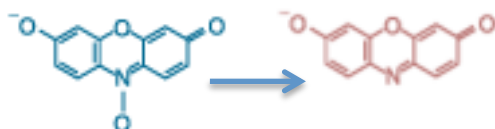


Figura 3.8 : Cambio de color durante la reducción de la resazurin en resofurin

El ensayo necesita la realización de una recta patrón con las mismas células que las usadas en el ensayo. Por lo tanto, se han por sembrado células sin andamio en una placa Nunclon Delta Surface de 24 pocillos siguiendo una escala de concentración para obtener la recta. Se eligieron 7 puntos de 0 – 25000 – 50000 – 100000 – 150000 – 200000 – 250000 – 300000 células por pocillos que han sido sembrados por triplicados en la dicha placa.

Para evaluar el crecimiento celular en los andamios se sembraron 50 000 células en 3 andamios de PLA/PEG, 3 andamios de PLA/PEG/G5, y 6 controles (3 controles material y 3 controles células) como explicado en la parte **3.a.v**.

Una vez ambas placas sembradas (PLA/PEG y PLA/PEG/G5), se dejaron incubar

durante 24 horas para que se adhirieran las células a los andamios o a la superficie de la placa en el caso del control células.

Al cabo de 24 horas, se quitó el medio de cultivo, y se añadió 600µL de medio nuevo recientemente preparado conteniendo medio de cultivo normal mezclado con un 10% de reactivo AlamarBlue® ; las placas se dejaron después al incubador durante una hora (el tiempo de incubación fue optimizado) para darle tiempo a la reducción de la resazurin de ocurrir y a partir de ahora, ya que el reactivo es fotosensible, las muestras se protegieron de la luz cubriéndolas con papel aluminio. Luego 3 replicados de mismo volumen (200µL) se recogieron de cada pocillo para ser puestos en una placa Nunclon Delta surface de 96 pocillos y medir su absorbancia mediante un lector de placas Tecan Infinite M200 Pro. Se leyó la fluorescencia entre las longitudes de onda 560nm y 590nm con un gain de 75 para no sobrepasar los límites de la sensibilidad de la máquina.

Finalmente se repitió este proceso para un, tres, siete, once y catorce días de cultivo.

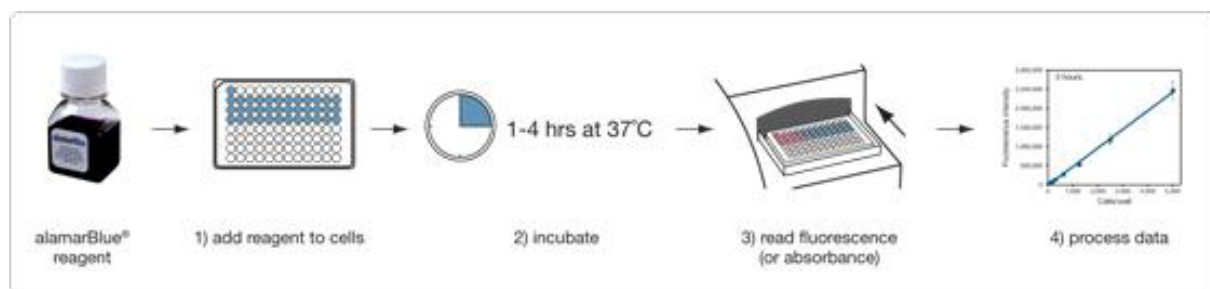


Figura 3.9 : Proceso general del ensayo de proliferación Alamar Blue [66]

3) Ensayos de diferenciación : Fosfatasa Alcalina y Osteocalcina

Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima ligada a la membrana celular a menudo usada como marcador de la diferenciación osteogénica. La ALP tiene la particularidad de descomponer éster-monofosfatasa en fosfato y grupo hidroxilo. El ensayo consiste en poner las células en contacto con un éster-monofosfatasa, el para-nitrofenol fosfato (pNPP) que es incoloro, y medir la tasa de producto descompuesto por la ALP, el paranitrofenol y fosfato que es amarillo.

Ya que las células diferenciadas, en este caso osteoblastos, llevan esta enzima, leer la absorbancia del extracto celular nos permite comparar la cantidad de fosfato, y por lo tanto de osteoblastos, que hay en la mezcla polimérica y en el material compuesto.

Para ver la evolución de la concentración en ALP, se hicieron ensayos a los 7,14,21 y 28 días. Se han sembrado 3 pocillos con 50 000 células de cada material, 3 controles material y 3 controles células por día.

También se realizó la mediación de ALP después de 7 y 14 días en medio osteogénico. Este medio lleva Adv. DMEM, 15% de FBS, 1% de P/E Penicillin, 1% de L-Glutamina, 1% y de ácido ascórbico, 1% de β -Glicerofosfato y 0,02% de Dexametasona.

Preparación de las soluciones de trabajo:

- Diluir 10 veces el buffer 10X (proporcionado en el kit SensoLyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay, Colorimetric) en Agua Milli Q, para obtener un buffer 1X y añadir 1 mg/mL de Albúmina Sérica Bovina (BSA).

- Diluir Fosfatasa Alcalina Standard 10 μ g/mL hasta alcanzar una concentración de 0,4 μ g/mL (1:25) en el buffer 1X previamente preparado. Hacer diluciones seriadas 1:1 para obtener concentraciones de 200;100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1 y 0 ng/mL. Servirán para la realización de la curva de calibración.

Preparación del extracto celular para obtener ALP:

Controles

Primero se tripsinizan las células para recogerlas en un eppendorf, y centrifugarlas a 300 g durante 5 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en PBS antes de centrifugar a 300g durante 5min. Se vuelve a añadir PBS, a centrifugar y descartar el sobrenadante. Luego, se añade 300 μ L por pocillo de M-PER antes de mezclar bien las muestras y se coloca al incubador a 4°C por 10min con agitación suave y constante.

Finalmente se centrifuga la suspensión celular a 14000g durante 10 minutos, y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo.

Material

Se traspasa el material de la placa a un eppendorf con 1mL de PBS. Se retira el PBS y se introduce el eppendorf con el material en nitrógeno líquido durante unos segundos. Ahora que está fragilizado se puede machacar el andamio con un bisturí hasta obtener trozos de un tamaño reducido. Se resuspende con PBS antes de seguir los mismos pasos que en el caso anterior (menos la tripsinización).



Preparación de la reacción enzimática:

Se añaden 50 μL de cada muestra y de cada una de las soluciones de ALP de la curva de calibración por pocillo en placas de 96 pocillos. Se siembran tres réplicas de cada muestra y de cada concentración en 3 placas diferentes. Se añaden luego 50 μL de “pNPP substrate solution” en cada pocillo de las muestras y de las concentraciones de ALP standard y se mezcla cuidadosamente agitando la placa. Luego se incuba a temperatura ambiente durante 20 min antes de leer una primera vez la absorbancia a 405 nm con el lector de placas Tecan Infinite M200 Pro.

Los valores de absorbancia se leyeron después de 20 minutos de incubación a 37°C.

Osteocalcina

La osteocalcina es una hormona peptídica lineal formada por 49 aminoácidos y producida por los osteoblastos durante la formación ósea, incorporándose dentro de la matriz del hueso. Se encuentra sólo en los tejidos óseos. Juega también un papel en los enlaces entre los iones calcio y la hidroxiapatita. Ya que es únicamente producida por los osteoblastos maduros, tal como el ensayo ALP, la osteocalcina permite cuantificar la proporción de CMr que se han diferenciado en osteoblastos. En este sentido, se usa un kit de inmunoensayo competitivo Metra (Quidel, USA) conteniendo tiras cubiertas de osteocalcina, un anticuerpo antiosteocalcina, un conjugado enzimático de IgG-fosfatasa alcalina y un sustrato pNPP (p-nitrofenilfosfato) para cuantificar la osteocalcina en el medio.

Primero los anticuerpos se acoplan en la osteocalcina pegada en las tiras, en el fondo del pocillo, y a la osteocalcina de las muestras. Luego los enzimas se añaden y se acoplan a los anticuerpos que no hayan sido ocupados por la osteocalcina. Finalmente, se incorpora el sustrato de pNPP que reacciona con el ALP del conjugado enzimático convirtiendo el sustrato en p-nitrofenol (pNP). Este último siendo amarillo, se puede leer la absorbancia en un espectrofotómetro : ya que se trata de un ensayo competitivo, la absorbancia medida es inversamente proporcional a la concentración de osteocalcina de las muestras.



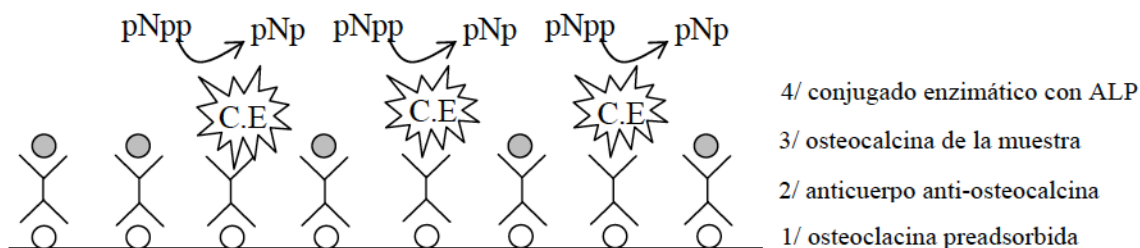


Figura 3.10: Principio del método de determinación de la cantidad de osteocalcina

[76]

Se evalúa la cantidad de ALP a los días 7, 14, 21 y 28 sembrado para cada uno 3 pocillos de cada material, 3 controles células y 3 controles material con 50 000 células por pocillos. A cada día, se recoge el medio sobrenadante de las muestras y los controles.

El protocolo para este ensayo es el siguiente :

Cada día de ensayo, se recoge el medio sobrenadante de las muestras y los controles. Se añaden 25μL de muestras, controles, y patrones (proporcionados en el kit) a los pocillos conteniendo las tiras cubiertas de osteocalcina (proporcionado en el kit). Luego se añaden 125μL de anticuerpo antiosteocalcina antes de incubar 2 horas a temperatura ambiente.

Seguidamente, se hacen tres lavados con PBS, se añaden 150μL de conjugado enzimático y se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente. Se lava de nuevo tres veces en PBS antes de añadir 150μL de sustrato.

Se incuba una ultima vez durante 40 minutos a temperatura ambiente y se añaden 50μL de solución de parada (NaOH, 0,5N) antes de leer la densidad óptica a 405nm.



4. Resultados y discusiones

4.1. Inmunofluorescencia

1) 3 días de cultivo

Una primera serie de fotos de inmunofluorescencia a los 3 días permitieron tener una idea de la adhesión y de la distribución de las células en los andamios. Se puede distinguir dos tipos de fotos, las azules donde se detecta los núcleos de las células (puntos azules claros o blancos) donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI y las rojas donde se puede observar la forma del citoesqueleto celular. Ya que los andamios son estructuras 3D, nos interesa también ver la población celular dentro de la estructura y el microscopio óptico solo no nos permite eso. Por esto se optó por utilizar la técnica de inmunofluorescencia. En este sentido, se hicieron cortes transversales y horizontales como lo enseñan la figura 4.1.

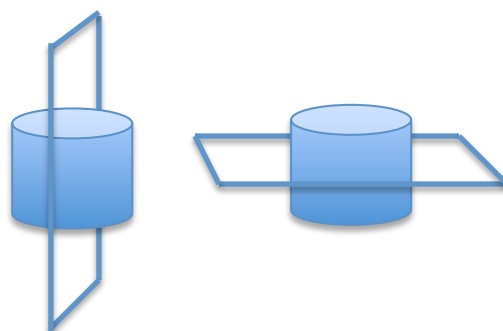


Figura 4.1 : Presentación de los dos tipos de cortes que se hicieron a los andamios para visualizar las células en su interior. *Izquierda* : Corte transversal, *Derecha* : Corte horizontal

Una de las incógnitas a la hora de diseñar un andamio es la distribución y el tamaño adecuado de los poros para que haya una buena colonización y migración celular dentro del andamio. Las imágenes de inmunofluorescencia a los 3 días muestran una buena distribución de las células en ambos materiales (mezcla polimérica y material compuesto). Se observó que las células adheridas estaban vivas. De hecho, la faloidina permite ver la forma de los citoesqueletos y se nota que estos están expandidos en la superficie del andamio y que no se han contraído en forma redondeada como ocurre cuando las células no se adhieren bien a la superficie o mueren. Sin embargo, se nota que en el PLA, los citoesqueletos son más contraídos y redondos que en el PLA/PEG/G5 donde se observan más extendidas (figura 4.3 c) , sugiriendo que las células tienen más afinidad con el vidrio que con el PLA solo. El

estudio de Navarro et al. ya demostraba esta diferencia de morfología celular entre los dos materiales [10]. El poco contraste presente en esas fotos es debido al hecho de que el material absorbe también faloidina además de la irregularidad de la superficie de los andamios que permite difícilmente enfocar correctamente.

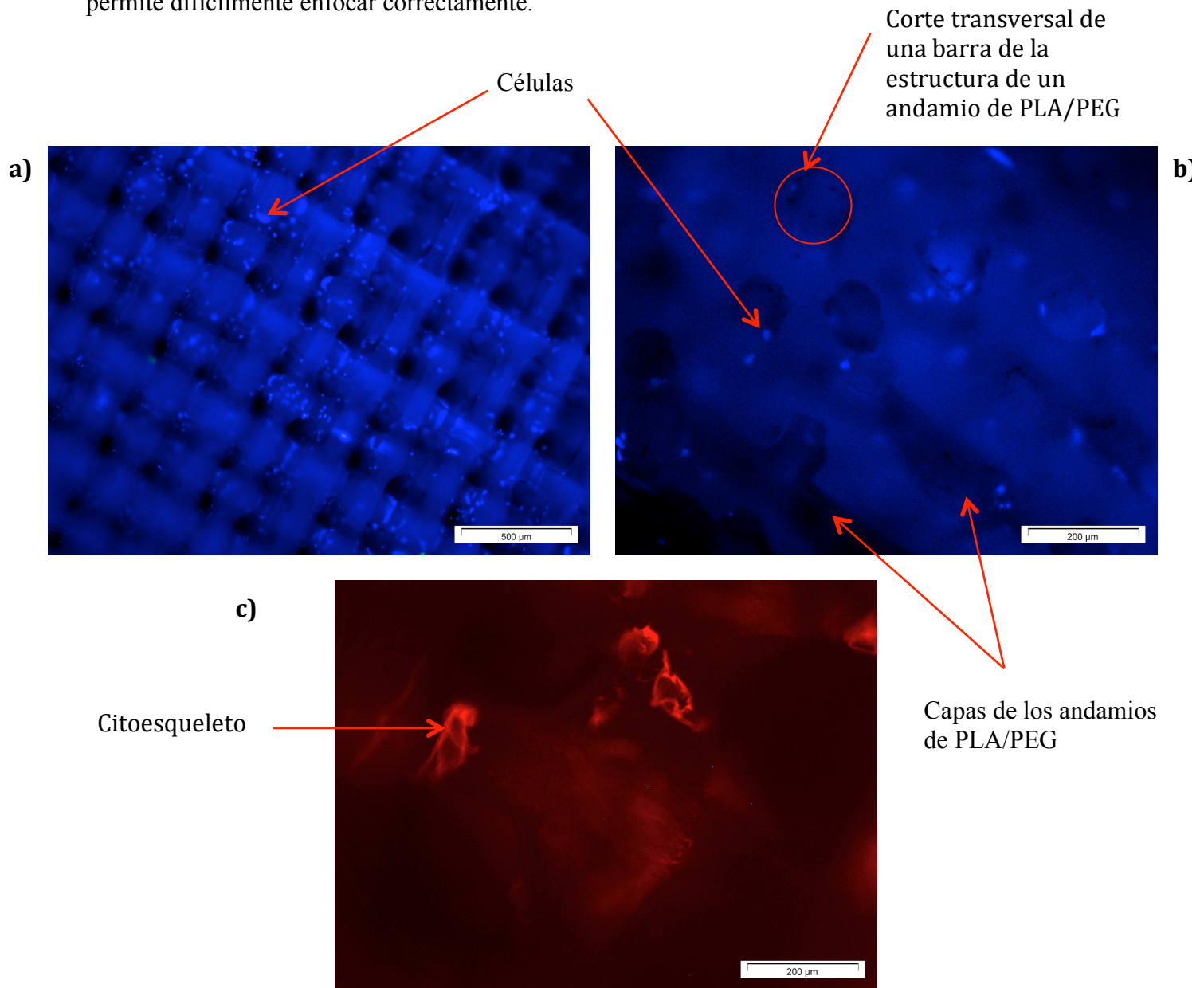


Figura 4.2 : Imágenes de fluorescencia de andamios de PLA/PEG después de 3 días de cultivo. a) Vista superior, b) Vista Transversal, c) Detección de la faloidina en un punto de cruce de las barras en vista superior.

Por otro lado, el corte transversal del andamio de PLA/PEG de la figura 4.2 b) nos permite ver que las células han colonizado todas las capas del andamio lo que nos asegura que

el tamaño de poro tal como el diseño general del andamio permite una buena movilidad de las células a través de la estructura.

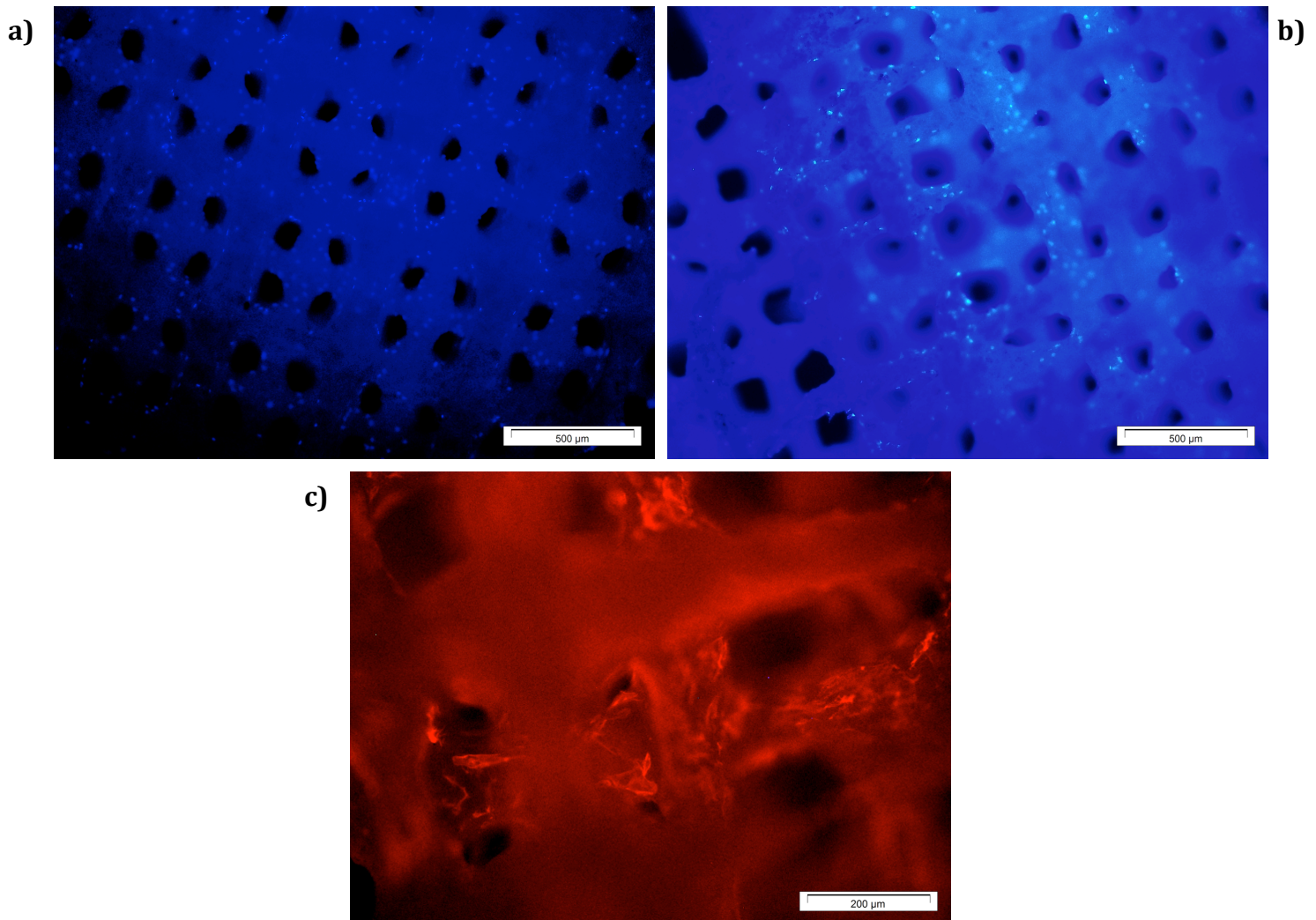


Figura 4.3 : Imágenes de fluorescencia de andamios de PLA/PEG/G5 después de 3 días de cultivo. a) Vista superior, b) Corte Horizontal , c) Detección de la faloidina en un cruce en vista superior.

Finalmente, desde un punto de vista general, se observó que hay cualitativamente más células en los andamios conteniendo el vidrio G5. Se puede por lo tanto concluir que la adición de G5, favorece la adhesión celular y la expansión de los citoesqueletos a tiempos cortos.

2) 14 días de cultivo

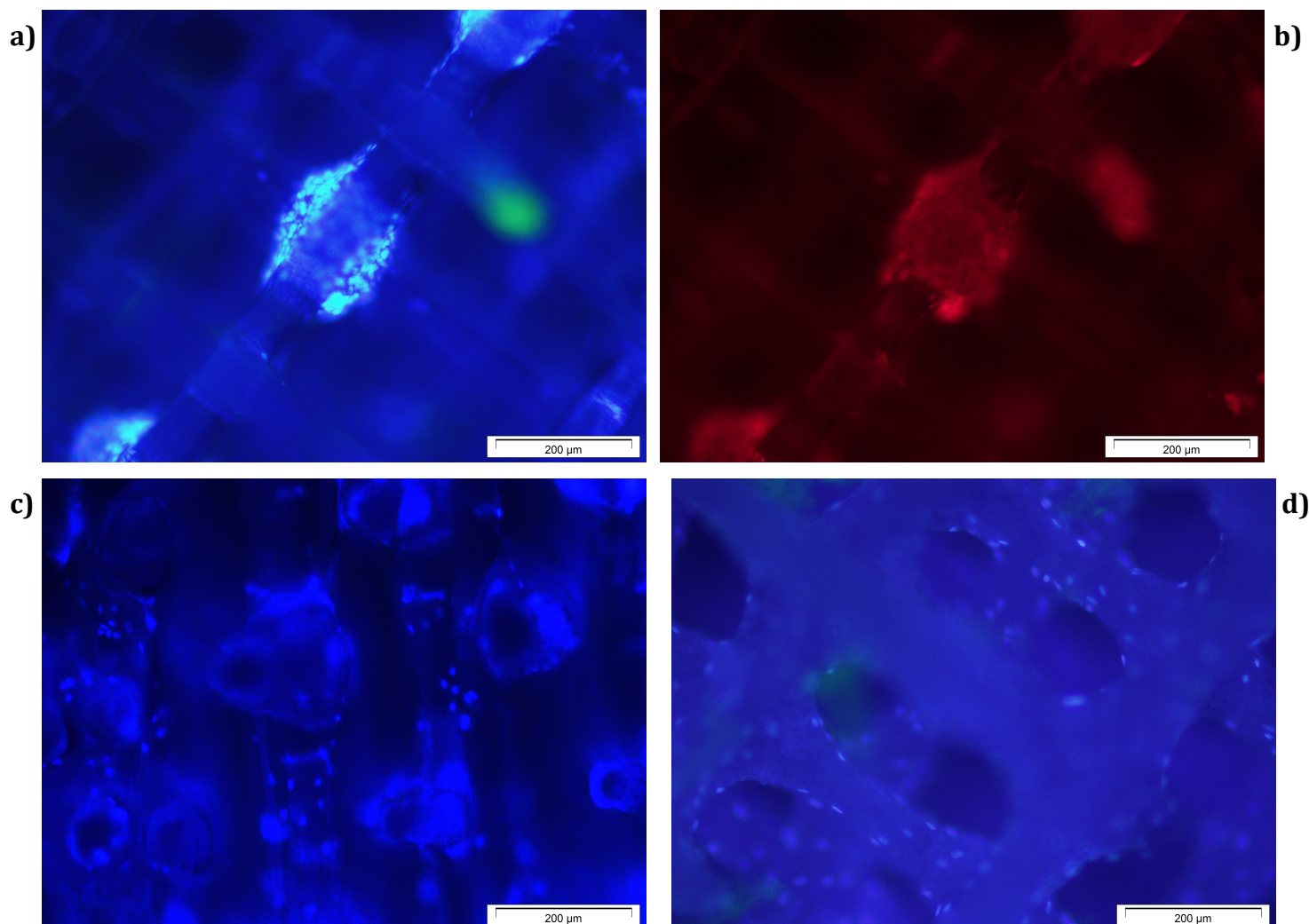


Figura 4.4 : Imágenes de fluorescencia de andamios de PLA/PEG después de 14 días de cultivo. a,b) Vista superior, c) Corte transversal , d) Corte horizontal

Después de 14 días, se nota sensiblemente la misma diferencia en las poblaciones de células de los dos tipos de andamios. Se ve una distribución homogénea de las células en todos los niveles de los andamios de material compuesto, incluso en el interior del andamio como lo enseña la figura 4.5. En cambio después de 14 días, las células en los andamios de PLA/PEG, aunque coloniczaron también todos los niveles de la estructura, tienden a aglomerarse en grupos en los cruces de la estructura (figura 4.4 a,b). Además, la diferencia en número de células apreciada entre los dos materiales se mantiene y aunque los aglomerados observados en el andamio de PLA/PEG presentan un gran número de células, se ven más, y mucho mejor distribuidas en los andamios que contienen vidrio. De hecho, la figura 4.5 (c,d)

muestra una gran homogeneidad en la distribución de las células incluso en el interior del andamio, lo cual corrobora lo expuesto anteriormente.

En cuanto a la morfología de la matriz extracelular, al cabo de 14 días se nota menos diferencia y parece que las células se expanden bastante bien en el andamio de mezcla polimérica, aunque no llegan a cubrir totalmente las barras de los andamios como ocurre en el material compuesto como se ve en la figura 4.5 b).

Finalmente, se puede concluir que las células usadas parecen tener más afinidad con el vidrio y que este último mejora la distribución de éstas en todo el andamio.

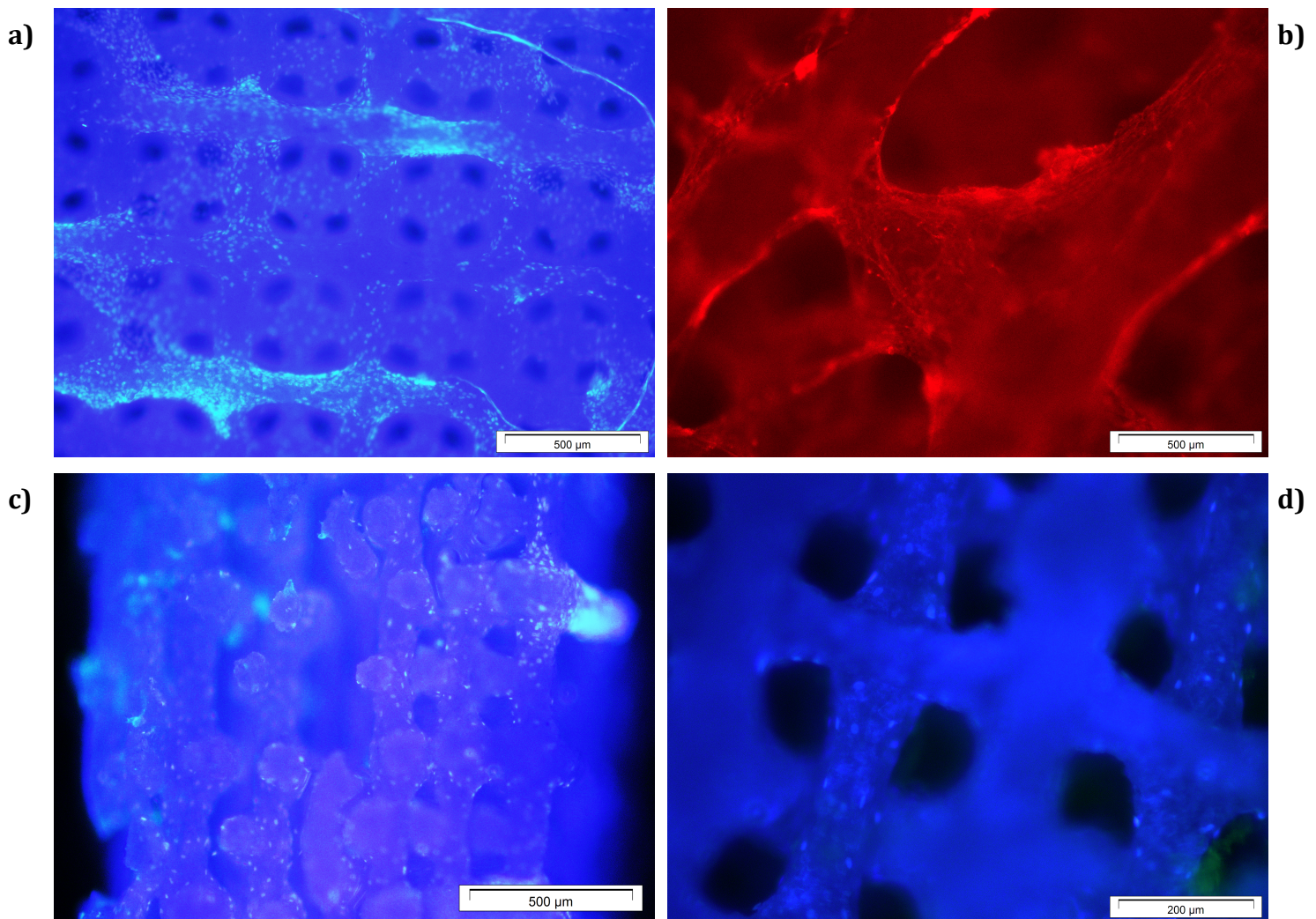


Figura 4.5 : Imágenes de fluorescencia de andamios de PLA/PEG/G5 después de 14 días de cultivo. a) Vista superior, b) Cruce en vista superior , c) Corte Vertical, d) Corte horizontal.

4.2. Proliferación celular (ensayo Alamar Blue)

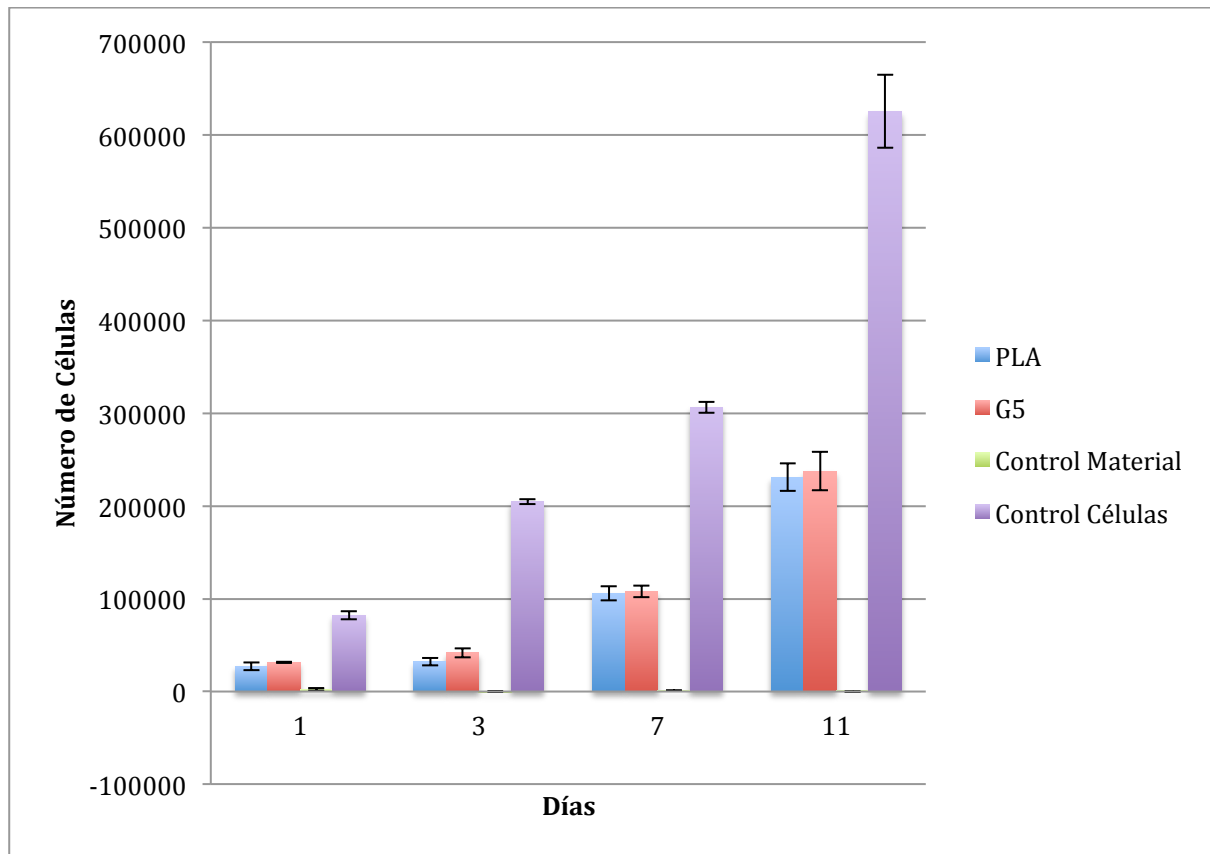


Figura 4.6 : Evolución del número de células en andamios de PLA/PEG y PLA/PEG/G5 a los 1,3,7 y 11 días.

Conociendo el número de células sembrado inicialmente en los andamios (50000 células/pocillo), se puede calcular el porcentaje de adhesión de las células. Así tenemos que una media de 27 000 células se quedaron en los andamios de PLA/PEG contra 31 000 en los de material compuesto dando unos porcentajes de 54% y 62% de células adheridas al primer día respectivamente.

Los resultados enseñan un aumento claro en la proliferación de las células en ambos andamios con el tiempo. Ya que al sembrar las células éstas tienden a caer en el fondo del pocillo, muchas de las células sembradas en los andamios se pierden. Sin embargo en el caso del control todas las células se adhieren en la superficie del pocillo. En el caso del andamio, una parte de las células sembradas cae en el fondo y ya que la superficie es antiadherente, y se quitan al primer cambio de medio.

Debido a esto, se observó una diferencia significativa en el número de células en el control hecho en la placa adherente y las células sembradas en los materiales estudiados.

Los controles material se usaron para asegurar que las células no crecen en las placas antiadherentes y que la absorbancia medida es correcta y es sólo debida a la población de células que ha crecido en el interior del andamio.

La leve ventaja dada al material con G5 en frente de la mezcla polimérica puede ser compensada por el error relativo sugiriendo por lo tanto que la adición de este vidrio favorece muy poco la proliferación celular contrariamente a lo que se esperaba. Un estudio de la varianza (ANOVA) permitió establecer la existencia o no de diferencias estadísticas significativas entre el PLA/PEG y el PLA/PEG/G5 [77]:

Tabla 4.7 : Valores de p obtenidos por ANOVA.

Tiempo	Material	Número de Muestras	Promedio (número de células)	Desviación Estándar	Valor de p
1 Día	PLA/PEG	3	27199	8248	0,000
	PLA/PEG/G5	3	416634	945	
3 Días	PLA/PEG	5	32042	7612	0,127
	PLA/PEG/G5	5	41664	10089	
7 Días	PLA/PEG	4	105777	15117	0,828
	PLA/PEG/G5	4	108025	12790	
11 Días	PLA/PEG	4	231008	29980	0,808
	PLA/PEG/G5	4	237487	41254	

Cuando el valor de p es superior a 0,05 se puede decir que, teniendo en cuenta la desviación estándar, la diferencia entre los promedios no es significativa o sea que los dos materiales presentan estadísticamente el mismo número de células. En el caso contrario ($p < 0,05$), la diferencia no se compensa con la desviación estándar y los promedios se consideran estadísticamente diferentes.

Se puede ver en la tabla 4.7 que de 1 hasta 3 días, la diferencia entre los números de células observados en el PLA/PEG y el material compuesto es significativa ($p = 0,000$). El G5 parece por lo tanto favorecer la adhesión celular en el primer día

siguiendo la siembra. En cambio, una vez pasados los 3 días, ya que los valores de p superan 0,05 ($p = 0,127$ 0,828 y 0,808 para 3,7 y 11 días) respectivamente, la diferencia no es tan significativa y se pueden considerar los promedios como estadísticamente iguales.

En conclusión de este ensayo, se puede decir que la adición de G5 favorece inicialmente la adhesión y la proliferación celular dentro de tiempos cortos. Y aunque las medidas dan un número de células aproximadamente igual en los dos materiales, las imágenes de inmunofluorescencia permitieron ver una mejor homogeneidad en la distribución de estas, incluso al interior de la estructura, en los andamios de material compuesto (no forman aglomerados como en el de PLA/PEG).

4.3. Fosfatasa Alcalina

1) Medida de ALP con medio normal

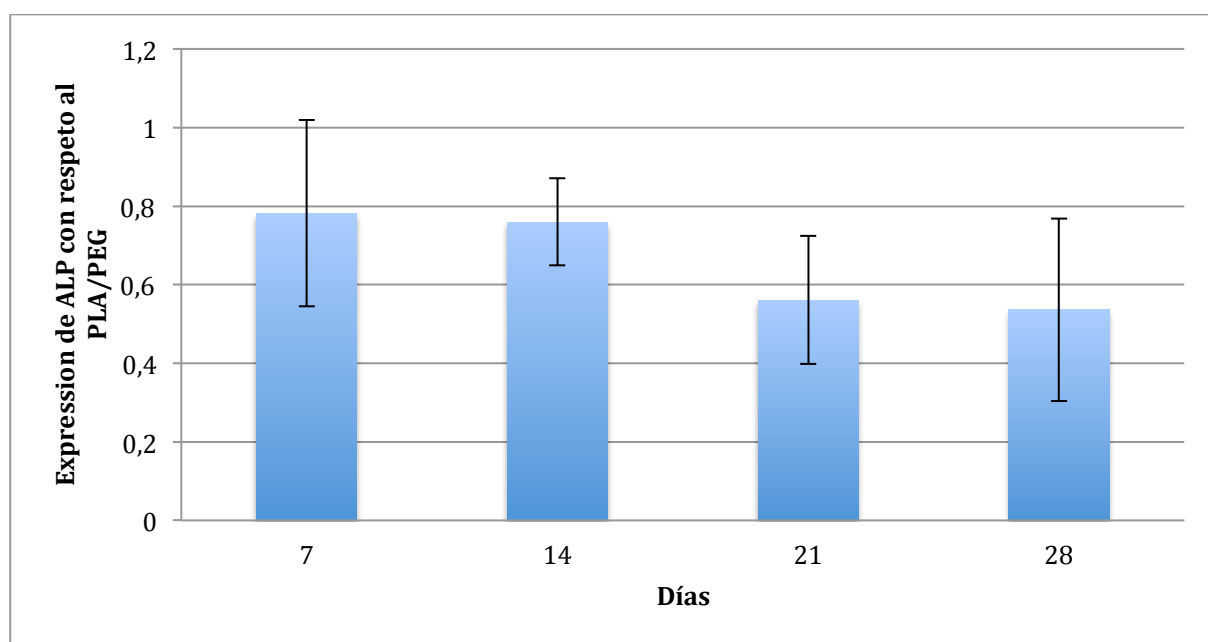


Figura 4.8 : Evolución de la concentración en ALP en andamios de PLA/PEG/G5 normalizado con respecto al PLA/PEG (n=5) a los 7,14,21 y 28 días.

Las concentraciones de ALP obtenidas en este ensayo reflejan la actividad de las células diferenciadas en preosteoblastos en el medio de cultivo. Ya que las células proliferan y se diferencian con el tiempo, se ha visto un aumento sensible de la cantidad de ALP medida asegurando de la proliferación de las células en los dos andamios. Para entender el efecto de la adición de vidrio en la expresión de ALP por las células, se normalizan las cantidades de ALP medidas en los andamios de material compuesto por las del PLA/PEG como se ve en la figura 4.8. Los resultados enseñan tasas siempre inferior a uno por lo que pareciera a primera vista que el vidrio G5 no induce la expresión de ALP más que el PLA/PEG. Para averiguarlo, se hizo un estudio de la varianza con ANOVA [77]. La tabla 4.9 muestra los valores de p y

nos permite confirmar que a excepción de a los 14 días, no hay diferencia significativa en las cantidades de ALP medidas en los dos materiales por lo cual se puede concluir que la adición de vidrio G5 no favorece la expresión de esta enzima sobre el PLA/PEG en medio de cultivo normal.

Tabla 4.9 : Valores de p obtenidos por ANOVA.

Tiempo	Material	Número de Muestras	Promedio de la cantidad de ALP (ng/mL)	Desviación Estándar	Valor de p
7 Día	PLA/PEG	5	1,49535	0,38538	0,393
	PLA/PEG-G5	5	1,16945	0,71016	
14 Días	PLA/PEG	5	1,34645	0,48261	0,039
	PLA/PEG-G5	5	0,71917	0,29799	
21 Días	PLA/PEG	5	1,78935	2,07957	0,328
	PLA/PEG-G5	5	0,78422	0,58182	
28 Días	PLA/PEG	5	4,85951	1,36100	0,092
	PLA/PEG-G5	5	2,60320	2,25420	

2) Medida de ALP con medio osteogénico

Se ha completado el ensayo precedente repitiéndolo con medio osteogénico. Ya que se usa con ambos materiales, se puede seguir comparando los resultados obtenidos para el PLA/PEG y el PLA/PEG/G5. Por falta de tiempo para producir nuevos andamios, y hacer crecer más células, se realizó este ensayo con sólo dos muestras de cada material lo que reduce la fiabilidad y precisión de los resultados.

Ya que se usa este medio para favorecer la diferenciación, se nota una cantidad de ALP expresada a los 7 y 14 días superior a la expresada con medio normal como lo enseña la tabla 4.11.

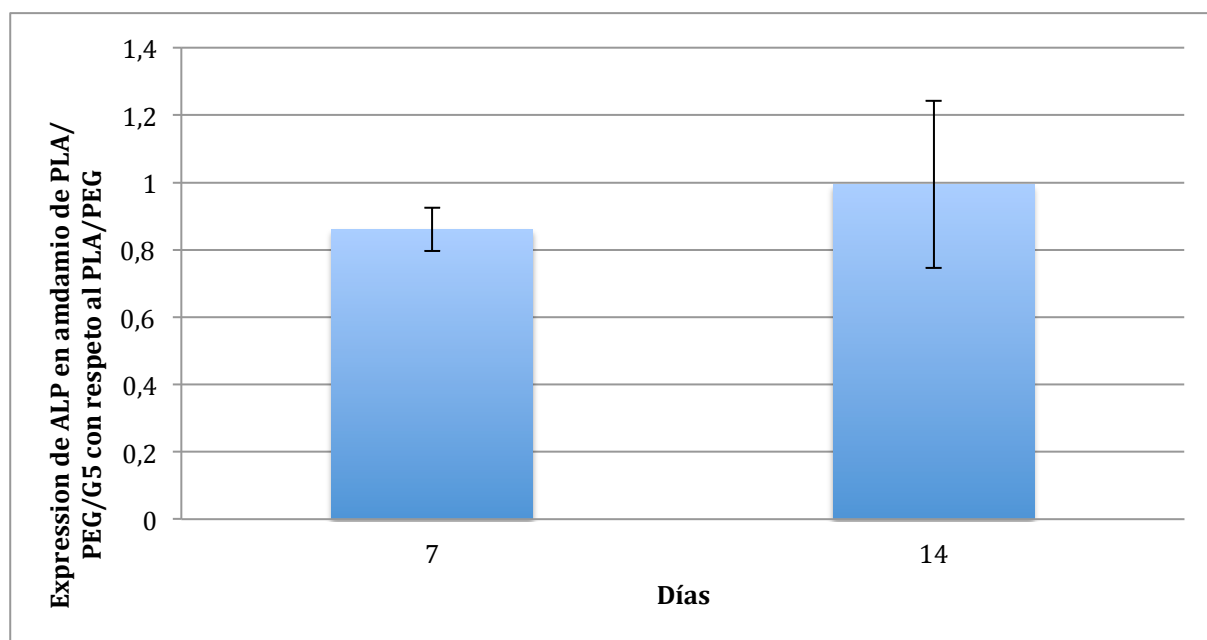


Figura 4.10 : Evolución de la concentración en ALP en andamios de PLA/PEG/G5 normalizado con respecto al PLA/PEG (n=2) a los 7 y 14 días con medio osteogénico.

Los resultados obtenidos con el medio osteogénico parecen corroborar los obtenidos con medio normal ya que los valores son incluidos entre 0,8 y 1. A pesar de que tan solo se utilizaron 2 muestras por punto, lo que es considerado como insuficiente para establecer la existencia de diferencia estadísticamente significativa. Se realizó un estudio de varianza usando nuevamente ANOVA. El análisis de la varianza con ANOVA (tabla 4.11) permitió ver que no hay diferencia estadística entre los dos promedios obtenidos y por lo cual se puede concluir que, incluso con medio osteogénico, la adición de G5 no parece favorecer la expresión de ALP.

Tabla 4.11 : Valores de p obtenidos por ANOVA.

Tiempo	Material	Número de Muestras	Promedio de la cantidad de ALP (ng/mL)	Desviación Estándar	Valor de p
7 Días	PLA/PEG	2	5,70915	0,66428	0,374
	PLA/PEG-G5	2	4,91503	0,73456	
14 Días	PLA/PEG	2	4,24836	1,29536	0,991
	PLA/PEG-G5	2	4,22548	2,11400	



Debido al bajo número de muestras usado, se propone repetir el experimento para $n=5$ en estudios futuros.

4.4. Osteocalcina

Debido a problemas de retraso en la entrega del kit de osteocalcina Metra, no ha sido posible llevar a cabo del ensayo, pero las muestras han sido recogidas para los días 7,14,21 y 28 y un estudio de la cantidad de osteocalcina pretendido a evaluar de manera tardía la diferenciación celular en osteoblastos será presentada en la defensa del proyecto.





5. Conclusiones

En el presente trabajo se ha estudiado el comportamiento de células mesenquimales de rata en contacto con andamios de PLA/PEG y PLA/PEG/G5 fabricados por rapid prototyping con el objetivo de determinar el efecto de la adición de vidrio de fosfato de calcio G5 dentro de dichas estructuras 3D. A partir de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. Los resultados obtenidos a partir del ensayo de Alamar Blue mostraron a tiempos cortos una mayor adhesión en el material compuesto PLA/PEG/G5 que en los andamios de PLA/PEG. De hecho, un 62% de las células sembradas inicialmente continúan adheridas a los andamios de material compuesto después de 24h, mientras que en los andamios de PLA/PEG un 54% de las células se adhieren.
2. Los ensayos de Alamar Blue mostraron una proliferación adecuada de las células en los dos tipos de andamios ensayados. A pesar de que ambos andamios siguieron una tendencia creciente hasta los 11 días de cultivo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales estudiados.
3. Los resultados de fosfatasa alcalina mostraron que ambos materiales inducen la expresión de esta enzima. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los andamios de PLA/PEG y los de PLA/PEG/G5 en medio de cultivo normal y osteogénico.
4. Los resultados de fosfatasa alcalina en medio osteogénico fueron mayores que en medio normal.
5. Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron un comportamiento celular distinto en ambos materiales a pesar de los resultados obtenidos con el Alamar Blue. Ambos tipos de andamios permitieron la colonización y adhesión de células en las diferentes capas interiores del andamio; sin embargo, la distribución de las células es mucho más homogénea en el caso del PLA/PEG/G5. En el caso del PLA/PEG las células tienden a formar agregados especialmente en los puntos de cruce de las barras que forman los andamios. Además, se ven cualitativamente más células en los andamios con vidrio G5 por lo que puede concluirse que la adición de este vidrio favorece la adhesión y migración celular dentro del andamio.
6. A tiempos cortos, 3 días, pareciera que las células adheridas al material con vidrio G5 presentan una morfología más extendida que las células adheridas a los andamios de PLA/PEG

Dada la complejidad de los estudios biológicos, se hubiese apreciado tener más tiempo para obtener más resultados y completar el estudio como la observación de las muestras con microscopía confocal para ver con más detalle la morfología de las células. Realizar cortes y tinciones histológicas para estudiar no solo la distribución celular sino la secreción de colágeno y verificar si las células se adhieren preferentemente a las partículas de vidrio o no. También sería interesante llevar a cabo estudiar la respuesta inflamatoria de dichos andamios y realizar un cocultivo de células mesenquimales y macrófagos para estudiar la formación de nuevo tejido en los andamios en presencia de células inflamatorias.



6. Costes e impacto ambiental del proyecto

6.1. Costes del proyecto

Los costes estimados de este proyecto se pueden dividir en tres partes distintas:

- Costes de los materiales y reactivos utilizados
- Costes del personal involucrado en el proyecto

Las tablas siguientes indican los costes que entran en cada categoría.

1) Materiales y reactivos

Tabla 6.1 : Costes de los materiales y reactivos

Producto	Precio/unidad	Cantidad	Precio Total
PLA	3000 €/kg	20 g	60 €
PEG	32,60 €/kg	1 g	0,33 €
G5	1722 €/kg	10 g	17,22 €
Ethanol	26 €/L	1 L	26 €
PBS	1,13 €/pastilla	5 pastillas	5,65 €
DMEM	7,20 €/L	2 L	14,40 €
AlamarBlue	7.800 €/L	20 mL	156 €
FBS	486,50 €/L	100 mL	48,65 €
Tripsina	190 €/L	200 mL	38 €
L-Glutamina	163 €/L	10 mL	1,63 €
Penicillin/Streptomycin	173 €/L	10 mL	1,73 €
Parafilm	22 €/unid	0,5 unid	11 €
Guantes	0,08 €/par	100 par	8 €
Flascones cultivo celular	30,34 €/unid	40 unid	1.213,60 €
Pipeta 5mL	0,58 €/unid	50 unid	29 €
Pipeta 10mL	0,75 €/unid	200 unid	150 €
Pipeta 25mL	0,82 €/unid	50 unid	41 €
Tubos 50 mL	0,14 €/unid	30 unid	4,20 €
Kit ALP	145 €/unid	1 unid	145 €
Kit osteocalcina	448 €/unid	1 unid	448 €
COSTE TOTAL			2.419,41 €

Además de los materiales precedentes, se usó también maquinas y salas con equipamiento específico. El acceso a las salas de cultivo, al microscopio de fluorescencia, al lector de placa o a la maquina de rapid prototyping no representan un coste adicional ya que este equipamiento pertenece a los laboratorios del IBEC.

2) Personal



Tabla 6.2 : Costes del personal movilizado

Personal	Precio/hora	Número de horas	Precio Total
Ingeniero Junior	15 €/h	600	9.000 €
Técnico	15 €/h	200	3.000 €
Investigador Senior	30 €/h	50	1.500 €
COSTE TOTAL			13.500 €

Estimación del coste total del proyecto: 15.919,41 €

6.2. Impacto ambiental

A lo largo de este proyecto se ha cuidado la dimensión ambiental de los productos utilizados. Los más usados fueron los materiales de los andamios (PLA, fosfato de calcio), y medios para el cultivo celular que no tienen ningún efecto o peligro para el entorno ni para la salud. El PEG, usado en muy poca cantidad en la fabricación del andamio es biodegradable y considerado por la Food and Drug Administration como un producto seguro.

No obstante el laboratorio sigue normas de separación estricta de residuos; los de cementos de fosfatos se almacenan en una basura específica y también se usaban contenedores para guantes y residuos plásticos, ácidos, bases, productos corrosivos, residuos de sales etc...

Agradecimientos

En esta parte me gustaría agradecer en primer lugar a las entidades que han facilitado los recursos necesarios para la realización de este proyecto. A la Escuela Europea de Ingenieros de Materiales (EEIGM), al Departamento de Biomateriales de l'ETSEIB y evidentemente, a todas las personas involucradas en los arreglos administrativos.

Me gustaría agradecer a Melba Navarro, quien ha aceptado tutorar este proyecto, por sus consejos que han permitido realizar todos los ensayos y la redacción de este informe.

Mis especiales agradecimientos son para Bélen Gonzalez, y Tiziano Serra cuya ayuda y colaboración ha sido fundamental. Les agradezco por la gran paciencia que han tenido y la implicación personal que han dedicado a este proyecto a pesar de muchas obligaciones.

Agradezco finalmente a todos los doctorados y investigadores del laboratorio por haber ayudarme en caso de necesidad, y también por su buen humor, lo que hizo mi estancia muy agradable.



7. Referencias

- [1] Langer.R, Vacanti.J.P. Tissue engineering (1993) Science, 260, pp 920-926.
- [2]<http://www.lajauneetlarouge.com/article/technologie-lingenierie-tissulaire-une-revolution-tres-proche-pour-de-nombreux-traitements> (leído el 21/11/12)
- [3] Myron Spector, Harvard Medical School. Tissue Engineering: The Next Revolution in Orthopaedic Surgery http://www.orthojournalhms.org/volume1/html/articles15.html#page_3
- [4] Xie.B, Parkhill.R.L, Warren.W.L, Smay.J.E. Synthesis direct writing of three dimensional polymer scaffolds using colloidal gels (2006) Advanced Functionnal Materials, 16(13), pp 1685-1693.
- [5] Kim, B.S. et al. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. (2001) Trends Biotechnol. 16, 224–230
- [6] Freed.L.E, Marquis.J.C, Nohira.A, Emmanuel.J, Mikos.A.G, and Langer.R. Neocartilage formation in-vitro and in-vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers (1993) Journal Biomedical Materials Research, 27, pp 11-23.
- [7] Liao CJ, Chen CF, Chen JH, Chiang SF, Lin YJ, Chang KY (March 2002). "Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method". Journal of Biomedical Materials Research 59 (4): 676–81
- [8] Mikos.A.G, Thorsen.A.J, Czerwonka.L.A, Bao.Y, Langer.R, Winslow.D.N, Vacanti.J.P. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams (1994) Polymer, 35, pp 1068-1077.
- [9] Dalton.P.D, Tim Woodfield, Hutmacher.D.W. Snapshot (2005) Porous scaffold design for tissue engineering, 4.
- [10] Navarro M, Serra T, Planell JP. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. (2012) Acta Biomaterialia
- [11] Park.C.B, Baldwin.D.F, Suh.N.P. Cell nucleation by rapid pressure drop in continuous processing of microcellular plastics (1995) Polymer Engineering Science 35, pp 432-440.
- [12] Baldwin.D.F, Shimbo.M, Suh.N.P. The role of gas dissolution and induced crystallization during microcellular polymer processing: a study of poly (ethylene terephthalate) and carbon dioxide systems (1995) journal engineering materials Techniques, 117, pp 62
- [13] Hyun Jung Chung, Tae Gwan Park. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for



tissue engineering (2007)

[14] Huang.Y.X, Ren.J, Chen.C, Ren.T.B, Zhou.X.Y. Preparation and Properties of Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/Nano-Hydroxyapatite (NHA) Scaffolds by Thermally Induced Phase separation and Rabbit MSCs Culture on scaffolds (2008) Journal Biomaterials Applications 22.pp 409

[15] Graham.P.D, Pervan.A.J, McHugh.A.J. The dynamics of thermal-induced phase separation in PMMA solutions (1997) Macromolecules, 30, pp 1651-1655.

[16] Wang.K, Thomas.C.H, Healy.K.E, Nuber.G. A novel method to fabricate bioresorbable scaffolds (1995) Polymer, 36, pp 837-842

[17] Sultana.N, Min Wang.Æ. Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterization of the scaffolds (2008) Journal Material Science, 19, pp 2555–2561.

[18] Li.B, Dutta Roy.T, Smith.C.M, Clark.P.A, Church.K.H. (2007) Proceedings of the 2007 International Manufacturing Science and Engineering Conference.

[19] Armillotta.A, Peltzer.R. Modeling of porous structures for rapid prototyping of tissue engineering scaffolds (2008) Journal of Advance Manufacturing Technology 39, pp 501–511.

[20] Lam.C.X.F, Mo.X.M, Teoh.S.H, Hutmacher.D.W Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer (2002) Materials Science and Engineering, C20, pp 49-56.

[21] Sachs.E, Cima.M, Williams.P, Brancazio.D, Cornie.J. 3-Dimentional printing –rapid tooling and prototypes directly from a CAD model (1992) Journal of engineering for industry, 114, pp 481-488

[22] Ang, T.H. et al. (2002) Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. Mater. Sci. Eng. C 20, 35–42

[23] Kim, S.S. et al. (1998) Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymeric scaffold with an intrinsic network of channels. Ann. Surg. 228, 8–13

[24] Seitz.H, Rieder.W, Irsen.S, Leukers.B, Tille.C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering (2005) Journal Biomedical Material Research B Applied Biomaterials, 74B, pp 782-788

[25] Jacobs.P.F. Fundamentals of stereolithography (1992) First European Conference on Rapid prototyping, pp 1-17.

[26] Chu, T.M.G. et al. (2001) Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. J. Mater. Sci. Mater.



Med. 12, 471–478

[27] Chu, T.M.G. et al. (2002) Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 23, 1283–1293

[28] Sodian.R, Loebe.M, Hein.A, Martin.D.P, Hoerstrup.S.P, Potapov.E.V, Hausmann.H, Lueth.T, Hetzer.R. A new approach to completely autologous cardiovascular tissue in humans (2002) *ASAIO Journal*, 48, pp 234-238

[29] Klocke.F, Celiker.T, Song.Y.A. Rapid metal tooling (1995) *Rapid Prototyping Journal*, 1, pp 32-42.

[30] Gault.R.S, Pham.D.T. A comparison of rapid prototyping technologies (1998) *International journal of machine tools & manufacture*, 38, pp 1257-1287.

[31] Vail, N.K. et al. Materials for biomedical applications. (1999) *Mater.Des.* 20, 123–132

[32] Tan, K.H. et al. Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. (2003) *Biomaterials* 24, 3115–3123

[33] Williamsa.J.M, Adewunmib.A, Scheka.R.M, Flanagan.C.L, Krebsbacha.P.H, Feinbergd.S.E, Hollistera.S.J, Dasb.S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering (2005) *Biomaterials*, 26, pp 4817–4827

[34] Hutmacher.D.W, Schantz.T, Zein.I, Ng.K.W, Teoh.S.H, Tan.K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling (2001) *Journal Biomedical Materials Research*, 55, pp 203-216.

[35] Moroni.L, de Wijn.J.R, van Blitterswijk.C.A. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties (2006) *Biomaterials*, 27, pp 974-985.

[36] Woodfield.T.B.F, Malda.J, de Wijn.J, Péters.F, Riesle.J, van Blitterswijk.C.A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique (2004) *Biomaterials*, 25, pp 4149-4161.

[37] Tellis.B.C, Szivek.J.A, Bliss.C.L, Margolis.D.S, Vaidyanathan.R.K, Calvert.P. Trabecular scaffolds created using micro CT guided fused deposition modeling (2008) *Materials Science and Engineering*, C28, pp 171–178.

[38] Samar, J.K. et al. Development of controlled porosity polymerceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. (2003) *Mater Sci Eng C23*, 611–620

[39] Vozzi, G. et al. Microsyringe-based deposition of two-dimensional and three-dimensional polymer scaffolds with a well-defined geometry for application to tissue engineering. (2002) *Tissue Eng.* 8, 1089–1098



- [40] M.P. Ginebra. El tejido óseo. Clases de Biomateriales (2012) UPC, ETSEIB.
- [41] <http://www.iambiomed.com>
- [42] Luc Avérous and Eric Pollet (Eds). Environmental Silicate Nano-biocomposites. Springer-Verlag (London). Publication 05/2012
- [43] Poirier & Al, Masson. Histologie, les Tissus, (2006)
- [44] Ishikawa K., Miyamoto Y., Kon M., Nagayama M., Asaoka K. Non-decay type fastsetting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. (1995) Biomaterials 16: 527-532.
- [45] Ishikawa K., Miyamoto Y., Takechi M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium. (1997) Journal of Biomedical Materials Research 36: 393-399.
- [46] Byrne DP, Lacroix D, Planell J a, Kelly DJ, Prendergast PJ. Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: application of mechanobiological models in tissue engineering. (2007) Biomaterials 28: 5544–5554.
- [47] Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. (2010) Journal of biomechanics 43:2881–2886.
- [48] M. E. R. Coimbra, C. N. Elias and P. G. Coelho “In vitro degradation of poly-l-d-lactic acid (PLDLA) pellets and powder used as synthetic alloplasts for bone grafting” (2008) J. of Materials Science: Materials in medicine.
- [49] Hench, L.L. Bioceramics - from Concept to Clinic. (1991) Journal of the American Ceramic Society 74, p.1487-1510.
- [50] A. Jonquières Clases de biopolímeros y polímeros biodegradables de la EEIGM (2011)
- [51] G. Castelan. Polymères biodégradables (2010)
- <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/bioprocedes-dans-les-domaines-de-la-sante-de-l-agroalimentaire-et-de-la-chimie-42163210/polymeres-biodegradables-bio4150/>
- [52] S. Buchatip, A. Petchsuk and K. Kongsuwan, Synthesis and Mechanical Properties of Poly (LLA-co-DLLA) Copolymers. (2008) Journal of metals, materials and minerals, Vol.18 No 175-180
- [53] Donald T. Reilly; Albert H. Burstein. The Mechanical Properties of Cortical Bone (1974)
- [54] M. Sheth, R. ANANDA KUMAR, V. Dave, R.A. GROSS, S.P. McCarthy Biodegradable Polymer Blends



of Poly (lactic acid) and Poly (ethylene glycol) (1997)

[55] Franks K, Abrahams I, Knowles JC. Development of soluble glasses for biomedical use. Part I: In vitro solubility measurement.(2000) *J Mater Sci Mater Med*;11:609–614.

[56] Clément J. Development and characterization of a totally degradable composite material for medical applications. (2001) PhD Thesis, Technical University of Catalonia; Barcelona.

[57] M. Navarro, M.P Ginebra, J. Clément, S. Martínez, G. Avila, and J.A. Planell Physicochemical Degradation of Titania-Stabilized Soluble Phosphate Glasses for Medical Applications, (2003)

[58] A. Aguirre, A. González, M. Navarro, Ó. Castaño, J.A. Planell, E. Engel1, Control of microenvironmental cues with a smart biomaterial composite promotes endothelial progenitor cell angiogenesis. (2012)

[59] Hutmacher, D.W. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. (2000) *Biomaterials* 21, 2529-2543.

[60] Hutmacher, D.W. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials per-spective. (2007) *J. Tissue Eng. Regen. Med.*1:245-260.

[61] Weigel T, Schinkel G, Lendlein A. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. (2006) *Expert Rev Med Devices* Nov;3(6):835-851.

[62] Kumar S, Kruth J-. Composites by rapid prototyping technology. (2010) pp 850-856.

[63] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. (2003) *Trends Biotechnol* pp157-161.

[64] Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. (2008) *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* pp 573-582

[65] Li, B. Robust direct-write dispensing tool and solutions for micro/meso-scale manufacturing and packaging. (2007) Pro-ceedings of the ASME International Manufacturing Science and Engineering Conference.

[66] <http://www.invitrogen.com>

[67] http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_en_book/ch01s05.html

[68] Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications Original Research Article Pages 169-176 Lei Nie, Dong Chen, Jinping Suo, Peng Zou, Shuibin Feng, Qi Yang, Shuhua Yang, PFC ETSEIB/IBEC – Laurent Puech



Shunan Ye.

[69] http://www.wtec.org/loyola/rp/06_02.htm

[70] <http://en.wikipedia.org/wiki/Stereolithography>

[71] http://en.wikipedia.org/wiki/Selective_laser_sintering

[72] <http://www.lecorpshumain.fr/corpshumain/1-os.html>

[73] <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/osteomorfo.html>

[74] Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa. E.B. Montufar Jiménez. Tesis doctoral, UPC, 2010.

[75] Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Differentiation among Bone, 2007 Vagaban, M.

[76] Nuevo tratamiento de oxidación en aleaciones de NiTi para aplicaciones biomédicas. A. Michiardi Tesis doctoral, UPC, 2005.

[77] <http://www.danielsoper.com/statcalc3/calc.aspx?id=43>

